



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA STROJNÍHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING

ÚSTAV FYZIKÁLNÍHO INŽENÝRSTVÍ

INSTITUTE OF PHYSICAL ENGINEERING

**JUSTÁŽNÍ KOLIMÁTOR PRO FLUORESCENČNÍ
HOLOGRAFICKÝ MIKROSKOP**

THE ADJUSTING COLLIMATOR FOR THE FLUORESCENT HOLOGRAPHIC MICROSCOPE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Kateřina Rosová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Zbyněk Dostál, Ph.D.

BRNO 2018

Zadání diplomové práce

Ústav:	Ústav fyzikálního inženýrství
Studentka:	Bc. Kateřina Rosová
Studijní program:	Aplikované vědy v inženýrství
Studijní obor:	Přesná mechanika a optika
Vedoucí práce:	Ing. Zbyněk Dostál, Ph.D.
Akademický rok:	2017/18

Ředitel ústavu Vám v souladu se zákonem č.111/1998 o vysokých školách a se Studijním a zkušebním řádem VUT v Brně určuje následující téma diplomové práce:

Justážní kolimátor pro Fluorescenční holografický mikroskop

Stručná charakteristika problematiky úkolu:

V současné době vyvinutý Fluorescenční holografický mikroskop (FHM) vyžaduje pro kvalitní naladění velmi přesné ustavení všech optických komponent. Proto je třeba navrhnout speciální justážní kolimátor, jehož svazek obsahuje záměrný obrazec, jehož charakter je neměnný po průchodech optickými komponentami mikroskopu. Kromě toho je nutno navrhnout vhodný detektor záměrného obrazce a měřicí software.

Cíle diplomové práce:

- 1) Stanovit požadavky na justážní kolimátor a jeho optické parametry.
- 2) Vytvořit konstrukční návrh justážního kolimátoru včetně výrobní dokumentace.
- 3) Navrhnout detektor záměrného obrazce včetně měřicího softwaru.
- 4) Vytvořit metodiku justážního postupu a otestovat justážní kolimátor s detektorem záměrného obrazce.

Seznam doporučené literatury:

VELECHOVSKÝ, K. , KOMRSKA, J. Využití Fresnelovy difrakce s nulovou intenzitou ve dvou na sebe kolmých směrech k vytyčování přímk. Jemná mechanika a optika, 2003, roč. 48, č. 6, s. 186-192. ISSN: 0447- 6441.

DOSTÁL, Z. et al. Automated alignment method for coherence-controlled holographic microscope. Journal of Biomedical Optics, 2015, 20.11: 111215-111215.

FUKA, J. , HAVELKA, B. Optika a atomová fyzika: fyzikální kompendium pro vysoké školy. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1961.

Termín odevzdání diplomové práce je stanoven časovým plánem akademického roku 2017/18

V Brně, dne

L. S.

prof. RNDr. Tomáš Šikola, CSc.
ředitel ústavu

doc. Ing. Jaroslav Katolický, Ph.D.
děkan fakulty

Abstrakt

Pro správné fungování Fluorescenčního holografického mikroskopu je nutné jeho vhodné seřízení, tedy provedení justáže všech optických komponent, které jsou v něm usazeny. Nejen u tohoto mikroskopu, ale také u Koherencí řízeného holografického mikroskopu, je přesná justáž velice kritickou podmínkou správného zobrazování. Proto je potřeba pro tyto mikroskopy vytvořit justážní kolimátor, pomocí kterého je možno oba přístroje seřídít. V teoretické části práce je zmíněna historie vzniku interferenční a holografické mikroskopie, z jejichž principů fluorescence holografická mikroskopie vychází. Také je zde sepsáno dosavadní poznání týkající se kolimátorů využívaných pro vytyčování přímek a jejich využití v praxi. Součástí práce je optický návrh kolimátoru, jeho konstrukční návrh a realizace. Pro používání kolimátoru v praxi byl vytvořen software pro detekci černého záměrného kříže. Ten pomáhá při vyhodnocení správnosti seřízení justovaného přístroje. Uvedeny jsou také popisy justáže vlastního kolimátoru a Fluorescenčního holografického mikroskopu, které jsou nezbytné pro správnou manipulaci a pro využití navrhovaného kolimátoru.

Abstract

For the proper function of the Fluorescence holographic microscope, it is necessary to adjust all the optical components of the microscope. Furthermore, the precise adjustment is the very critical condition for proper imaging of the Coherence-controlled holographic microscope. Therefore, it is necessary to create a sight collimator for these microscopes for their adjustment. The fluorescence holographic microscope is based on an interference and holographic principles, whose history is mentioned in the theoretical part of the thesis. The existing state of the art of laser sight collimators and their use in practice is also mentioned. The optical and mechanical design of the laser sight collimator and its realization are described in the next part of the thesis. The software for detecting the black sight cross was created for the use of the laser sight collimator in practice. The software is necessary to evaluate the correctness of the alignment of the adjusted microscope. The descriptions of the adjustment procedures for the laser sight collimator and for the Fluorescence holographic microscope are mentioned in the last part of the thesis. These procedures are necessary for proper manipulation and use with the proposed laser sight collimator.

Klíčová slova

Holografie, interferenční mikroskopie, holografická mikroskopie, fluorescence holografická mikroskopie, laserový zaměřovač, difrakce, simulace, software.

Keywords

Holography, interference microscopy, holographic microscopy, fluorescence holographic microscopy, laser sight, diffraction, simulation, software.

ROSOVÁ, K. *Justážní kolimátor pro fluorescenční holografický mikroskop*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2018. 46 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Zbyněk Dostál, Ph.D.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod odborným vedením Ing. Zbyňka Dostála, Ph.D., a že všechny materiály, ze kterých jsem čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

.....

V Brně 25. května 2018

Děkuji Ing. Zbyňkovi Dostálovi, Ph.D., za odborné vedení, cenné rady, podporu a trpělivost. Dále děkuji panu prof. RNDr. Jiřímu Komrskovi, CSc. za pomoc s výpočty difrakce a Ing. Matěji Týčovi, Ph.D. za konzultace simulací v programu Python. Za vyrobení difrakční masky patří díky Ing. Jakubovi Sadílkovi. Část práce byla provedena za podpory výzkumné infrastruktury CEITEC Nano (ID LM2015041, MŠMT, 2016–2019), CEITEC Vysoké učení technické v Brně.

Obsah

Úvod	3
1 Interferenční a holografická mikroskopie	5
1.1 Kvantitativní fázový kontrast	5
1.2 Kvantitativní fázová mikroskopie	5
1.2.1 Interferenční mikroskopy	6
1.3 Holografická mikroskopie	8
1.3.1 Koherenci řízená holografická mikroskopie	10
1.3.2 Fluorescenční holografická mikroskopie	12
2 Cíle práce	15
3 Vytyčování přímek	17
3.1 Současné laserové metody vytyčování přímek	17
3.1.1 Metody využívající prostého svazku	17
3.1.2 Difrakční metody vytyčování přímek	17
3.1.3 Další metody vytyčování přímek	19
4 Návrh kolimátoru	21
4.1 Optický návrh	21
4.2 Simulace difrakčního obrazce	24
4.3 Konstrukční návrh	28
4.4 Software pro detekci záměrného kříže	33
4.5 Justážní postupy a testování kolimátoru	35
4.5.1 Justážní postup kolimátoru	35
4.5.2 Justážní postup FHM a ověření jeho nastavení	36
Závěr	39

Úvod

Ve světelné mikroskopii lze zkoumaný předmět pozorovat mnoha způsoby. Pomocí klasického světelného mikroskopu je možné jednoduše sledovat amplitudové vzorky, protože běžné detektory (jako je např. lidské oko, digitální čip nebo fotografický film) jsou citlivé na intenzitu dopadajícího světla, která odpovídá kvadrátu modulu amplitudy dopadající vlny.

Při zkoumání buněčných struktur jsou velmi často pozorovány vzorky fázového charakteru. To znamená, že při prostupu světelné vlny vzorkem dochází ke změně její fáze, zatímco amplituda je ovlivněna minimálně. Takové vzorky se při pozorování ve světlém poli zobrazují nekонтрастно (transmisivita těchto vzorků bývá velmi podobná okolnímu prostředí). Aby byly fázové vzorky lépe vidět, je potřeba je zvýraznit, tedy převést změnu fáze vlny na změnu intenzity, která je následně detekována. Na tomto principu byly založeny metody pro zvýraznění změny fáze. Mezi ně jsou řazeny: Zernikeho fázový kontrast [1], Nomarského diferenciální interferenční kontrast [2] a Hoffmanův modulační kontrast [3].

Zernikeho fázový kontrast je jednoduchá a účelná metoda, kterou je možné použít v podstatě na každém transmisním mikroskopu. Tato metoda umožňuje kontrastní zviditelnění fázových objektů následujícím způsobem. Nasvícení vzorku je provedeno pomocí amplitudové masky ve tvaru propustného mezikruží vloženého v zadní ohniskové rovině kondenzoru. Vzorek způsobí daný fázový posun mezi světlem na něm rozptýleným a nerozptýleným. Nerozptýlené světlo je fázově posunuto o $\pi/2$ pomocí fázové masky v zadní ohniskové rovině objektivu. V obrazové rovině, kde spolu interferuje rozptýlené i nerozptýlené světlo, se potom projeví kontrastní změna intenzity. Nevýhodou této metody je, že se v místech velkého gradientu indexu lomu (např. u okraje buňky) objevuje halo efekt a znemožňuje tak určit přesné hranice mezi pozorovaným předmětem a okolním prostředím. Další metoda, Nomarského diferenciální interferenční kontrast (DIC), využívá rozdílů optických drah k zobrazení vzorku. Ten vzniká při průchodu dvou příčně posunutých svazků pozorovaným vzorkem. Kontrast je dán jejich interferencí a obraz pak připomíná šikmé nasvícení vzorku.

Zobrazením pomocí těchto technik není možné měřit fázový posun světla, který způsobuje vzorek, nejsou totiž kvantitativní. Proto byly navrženy takové techniky, které kvantitativní zobrazení umožní. Jejich základem jsou různé typy interferometrů. Systémy vyvíjené na VUT FSI ve výzkumné skupině prof. RNDr. Radima Chmelíka, PhD. využívají plošné polychromatické zdroje světla a vyžadují pro seřízení speciální zaměřovač, jehož návrhem je třeba se zabývat.

1 Interferenční a holografická mikroskopie

1.1 Kvantitativní fázový kontrast

Změnu fáze umožňuje kvantitativně určit interferenční mikroskopie, která využívá kvantitativní fázové zobrazení QPI (z angl. Quantitative Phase Imaging) [4]. Díky tomuto zobrazení je možný záznam nejen amplitudy, ale i fáze světelné vlny prošlé vzorkem nebo od vzorku odražené. Záznam o změně fáze přitom umožňuje získat informace o morfologii a topografii pozorovaného vzorku, a to s velkou přesností (až v desetinách nanometru [5]).

Předností kvantitativního fázového zobrazování je také to, že není invazivní. Není tedy nutné používat pro zvýšení kontrastu toxické látky (jako jsou například fluorescenční barviva). Proto je vhodné tuto metodu použít pro pozorování nejen technických, ale především biologických vzorků. Při aplikacích v biologické oblasti se metoda kvantitativního fázového zobrazení používá pro sledování dynamiky a morfologie buněk, pro vyhodnocování a měření tzv. suché hmoty buňky [6, 7], a také při sledování pohybu buněk v prostoru [8]. V technických aplikacích se využívá především k měření topografie vzorku [9]. Díky některým metodám kvantitativního fázového zobrazování je možné tvořit také optické řezy, numericky přeastřovat, využít tomografického zobrazování apod. Umožňuje též nasimulovat zobrazení dalšími technikami, jako je např. světlé pole, temné pole, Nomarského diferenciální interferenční kontrast, Zernikeho fázový kontrast nebo interferenční kontrast [10].

Existuje mnoho využití kvantitativního fázového zobrazování. Mezi nejvýznamnější patří pozorování transparentních (biologických) vzorků v prošlém světle s využitím interferenční a holografické mikroskopie.

1.2 Kvantitativní fázová mikroskopie

Kvantitativní fázová mikroskopie se začala rozvíjet od roku 1893, kdy Sirks popsal první interferenční mikroskop, který byl založen na principu Mach-Zehnderova uspořádání interferometru. Vyznačoval se tím, že měl oddělenou předmětovou a referenční větev [11, 12]. Jako první také použil označení „Interferenční mikroskop“. Od té doby bylo navrženo a popsáno velké množství různých uspořádání interferenčních mikroskopů. Jejich výčet je uveden např. v [13]. Historický přehled transmisní interferenční mikroskopie aplikované v biologické oblasti je uveden v článku [14], přehled modernějších technik je uveden např. v [15].

V první polovině 20. století se objevily první komerčně vyráběné interferenční mikroskopy, které byly konstrukčně náročné a především finančně nákladné. Objev holografie, laseru, a také velký rozvoj výpočetní techniky, digitálních obrazových detektorů a rychlosti zpracování dat koncem 20. století, přinesl větší zájem o interferenční mikroskopii a otevřel cestu k novým možnostem jejího uplatnění. To vedlo také k výraznému rozšíření používání těchto mikroskopů.

Zejména transmisní mikroskopie je od 90. let 20. století aplikována pro pozorování živých buněk. Její výhodou je již zmiňovaný kvantitativní fázový kontrast (QPI), který

vzniká bez barvení buňky, a tudíž bez toxických efektů na živou buňku a dává možnost kvantitativně a v reálném čase pozorovat změny v živých buňkách. Velmi významným pro toto využití byl objev Daviese a Wilkinse (1952) [7]. Kvantitativní fázové zobrazení pozorované buňky je přímo závislé na množství její suché buněčné hmoty. To vedlo k možnosti opticky vážit pozorované vzorky a sledovat změny hustoty nitrobuněčné hmoty vzorku v reálném čase [16].

V současné době můžeme světelné interferenční mikroskopy, které mají oddělenou referenční a předmětovou větev mikroskopu, dělit do dvou hlavních kategorií podle geometrie skládání světelných svazků. Mikroskopy jsou, přesněji řečeno, rozděleny podle úhlu, který mezi sebou svírají paprsky referenční a předmětové větve ve výstupní rovině interferometru. Pokud je úhel nulový nebo velmi blízký nule, dochází k tomu, že se paprsky scházejí v ose (in-line). Jedná se tedy o interferenční mikroskopy. Je-li úhel mezi interferujícími paprsky nenulový, dochází k mimoosové (off-axis) interferenci. V tomto případě mluvíme o holografických mikroskopech.

1.2.1 Interferenční mikroskopy

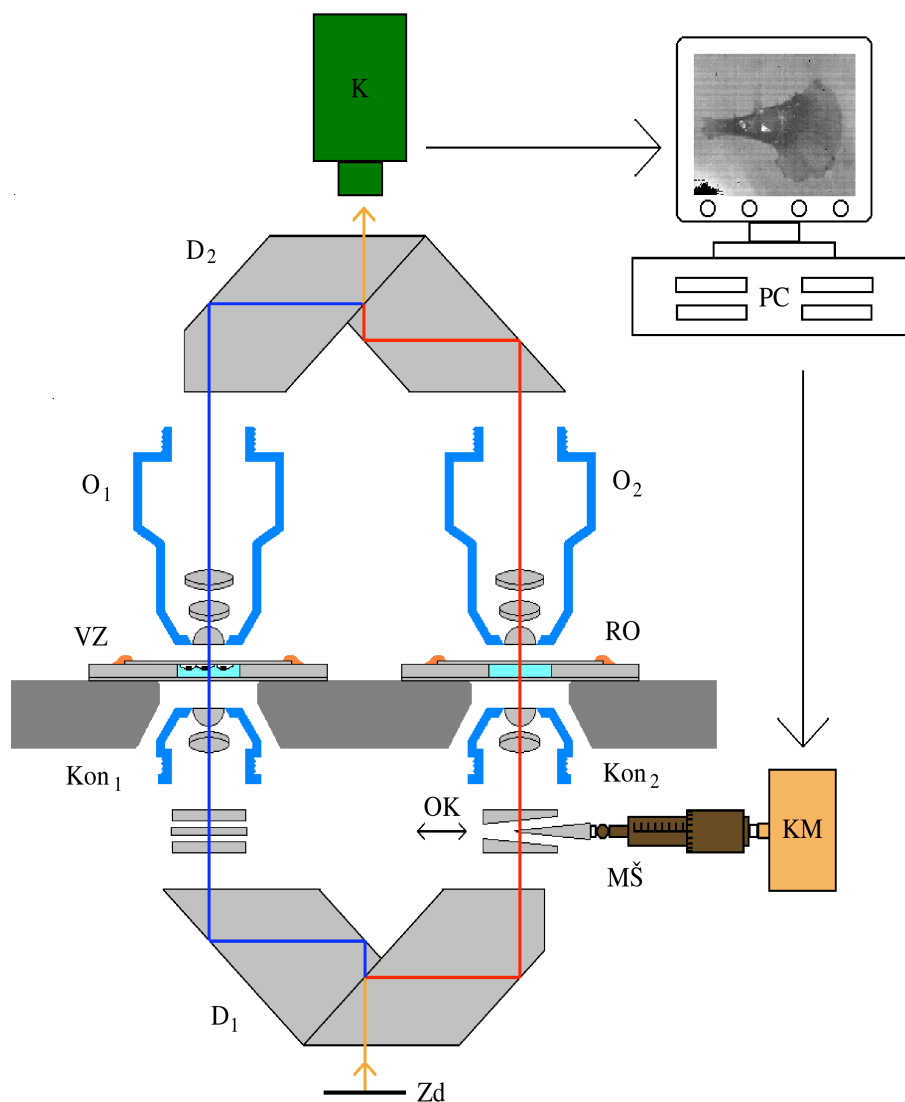
Interferenční mikroskopy lze rozdělit podle různých parametrů, jako je např. počet interferujících svazků, způsob průchodu svazků optickými prvky, způsob vytvoření referenčního svazku, způsob kombinace svazků ve výstupní rovině interferometru apod. [10]. Pokud jsou mikroskopy dvoucestné, znamená to, že předmětový a referenční světelný svazek jsou v prostoru odděleny a procházejí vlastní optickou soustavou. Pozorovaný vzorek proto nijak neovlivní referenční svazek.

Kombinování svazků in-line (pod nulovým nebo téměř nulovým úhlem) umožňuje použití nekoherentního zdroje světla. Tím je např. plošný širokospektrální zdroj světla, který nemá takové nedostatky jako koherenční zdroje. Těmito nedostatky jsou především koherenční zrnitost a šum přidáný do záznamu interferogramu.

Získaný interferogram má velmi nízkou prostorovou frekvenci interferenčních proužků (řádově jednotky proužků v zorném poli) a neobsahuje úplné informace o předmětové vlně (o její fázi a amplitudě), proto je nutné zaznamenat alespoň tři snímky v jedné sérii (obvykle se jich pořizuje tři až sedm snímků) s různým vzájemným fázovým posunem interferenčních vln. Zpracováním série snímků získáváme hodnoty rekonstruované fáze v intervalu $(0, 2\pi)$, ze kterých lze získat QPI předmětu. Interferenční mikroskopy využívají fázový kompenzátor, který pro pořízení interferogramu posouvá fázi jedné z vln. Takovéto mikroskopy jsou označovány jako interferometry s řízenou změnou fáze, zkratkou PSI (z angl. Phase-Shifting Interferometry).

Transmisní interferenční mikroskopie má mnohem širší a bohatší historii než mikroskopie reflexní (na odraz). Hojně se využívala pro pozorování biologických preparátů už od 50. let 20. století, kdy se začaly objevovat první komerčně vyráběné interferenční mikroskopy se zcela oddělenými větvemi. Asi nejznámější je Hornův mikroskop [17, 18], jehož schéma je uvedeno na obrázku 1. Plošný polychromatický zdroj světla Z_d je pomocí hranolového děliče svazku D_1 rozdělen na dvě větve, předmětová a referenční. Světlo v předmětové větvi prochází vzorkem VZ (kultivační komůrkou) a v referenční větvi po-

uze referenčním objektem RO (referenční komůrkou), který má stejnou tloušťku jako komůrka se vzorkem VZ. Do obou větví interferometru je vřazena osvětlovací a zobrazovací optika. Světlo z obou větví interferometru se pomocí dalšího hranolového děliče svazku D_2 složí a na detektoru K (CCD kamera) vzniká interferogram. Pro metodu zobrazení s řízenou změnou fáze je v referenční větvi umístěna sestava optických klínů OK, které umožňují měnit délku optické dráhy tak, aby bylo možno dosáhnout požadovaných fázových rozdílů interferujících vln. Pohyb klínů OK je řízen počítačem pomocí krokového motoru a mikrometrického šroubu.



Obrázek 1: Schéma Hornova mikroskopu. Zd - zdroj světla, $D_{1,2}$ - děliče svazku, $Kon_{1,2}$ - kondenzory, VZ - vzorek, RO - referenční objekt, OK - optické klíny, $O_{1,2}$ - objektivy, K - kamera, PC - počítač, KM - krokový motor a MŠ - mikrometrický šroub. Převzato z [18].

Další interferenční in-line mikroskopy jsou uvedeny např. v patentech [19, 20]. Jedná se také o achromatické mikroskopy s polychromatickým zdrojem světla. V mikroskopu dle patentu [19] je použit hranolový dělič, který rozděluje svazky z první a druhé větve

k několika detektorům současně. Na každý detektor dopadají svazky již s daným fázovým rozdílem, proto není třeba měnit velikost fázového rozdílu svazků mechanicky. Toto uspořádání zvyšuje rychlost snímání mikroskopu. Nevýhodou tohoto uspořádání jsou nižší hodnoty kamerami zaznamenávaných intenzit, což se může projevit na zvýšené hladině šumu v obraze. Fluorescenční mikroskop z patentu [20] má pouze jeden detektor, takže je jeho využití kvůli nutnosti časové posloupnosti omezeno pouze na statické objekty. Vzorek je pozorován i osvětlován pomocí obou mikroskopových objektivů. Mikroskop využívá dělič paprsků, který je použit zároveň v osvětlovací i zobrazovací části, protože jejich uspořádání je v podstatě totožné. Optickou dráhu referenčního svazku je možné měnit pomocí jednoho či více vhodně umístěných zrcadel. Nasnímaná data z mikroskopu mají charakter konfokálních řezů a lze z nich rekonstruovat trojrozměrné zobrazení vzorku [21].

Klasické interferenční mikroskopy nejsou v dnešní době příliš komerčně rozšířenými přístroji a téměř každý typ přístroje je unikátní. Nicméně u všech typů přístrojů platí, že jejich správná funkce a kvalitní záznam jsou závislé na kvalitě získané interference, tedy kontrastu interferenční struktury. V dnešní době jsou ale vyvíjeny in-line moduly, kterými lze pomocí metody krokování fáze interferujících vln docílit kvantitativního fázového zobrazení. Těmito technikami je metoda FPM (Fourier Phase Microscopy) [22] a metoda SLIM [23]. Obě metody jsou založeny na principu, při kterém je do optické cesty interferometru vložen fázový modulátor světla, který cíleně posouvá fázi referenční větve. Metody SLIM se využívá např. i při zobrazování v tomografii [24].

Použití interferenčních mikroskopů není vhodné pro zaznamenávání rychlých dějů, protože čas potřebný k zaznamenání a kombinaci tolika snímků je příliš velký na to, aby se výsledný obraz dal pozorovat v reálném čase. Proto je nelze využít např. pro pozorování rychle se pohybujících živých buněk. Během záznamu se také mění podmínky pozorování, např. vliv proudění v okolním prostředí a vliv vibrací zařízení negativně ovlivňují kvalitu a přesnost výsledného zobrazení zvýšením šumu. Tuto nevýhodu odstraňuje holografická mikroskopie.

1.3 Holografická mikroskopie

Digitální holografické mikroskopy (DHM) jsou dvousvazkové interferenční systémy s off-axis uspořádáním. V jejich výstupní rovině je vytvořen hologram s vysokou prostorovou frekvencí interferenčních proužků (typicky jsou to stovky až tisíce proužků v zorném poli). Kombinování svazků pod nenulovým úhlem [25] má velký vliv na vlastnosti vzniklého interferenčního obrazce. Takto vzniklý interferogram je v podstatě hologramem. To znamená, že je možné z jednoho snímku kompletně rekonstruovat předmětovou vlnu. Jedná se tedy o mikroskopy tvořící interferenční obrazce s nosnou prostorovou frekvencí. Jak vyplývá z pojmu „holografie“ (z řeckého *holos* = úplný a *grafie* = záznam), je patrné, že se jedná o metodu určenou k úplnému záznamu světelné vlny. Na rozdíl od klasické fotografie, kde je zachycena pouze intenzita světla, zaznamenává holografický snímek nejen amplitudu vlny, ale i její fázi, tedy vlnu jako celek. Princip holografie popsal v roce 1948 Dennis Gabor [26] jako možnost pro zlepšení rozlišení elektronového mikroskopu. A za tento svůj průlomový objev získal v roce 1971 Nobelovu cenu. V podstatě se jednalo

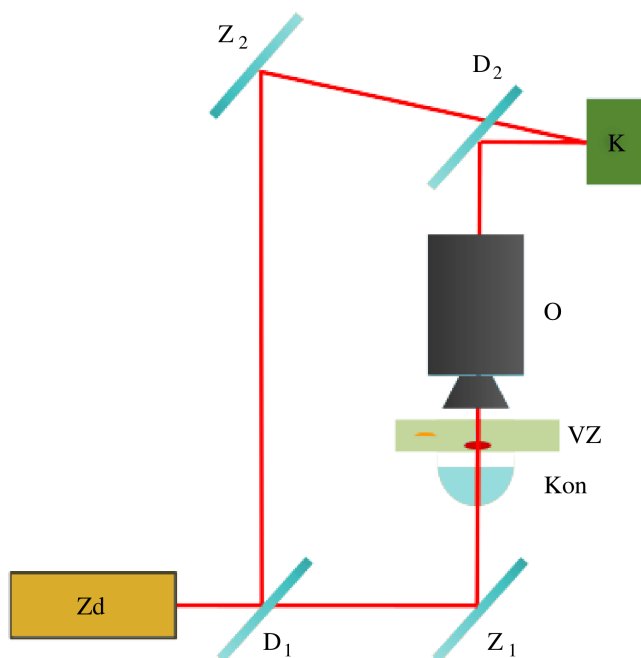
o záznam Fresnelova difrakčního obrazce pozorovaného objektu a jeho následné použití pro rekonstrukci obrazu objektu. Původní problémy s realizací záznamu hologramu byly překonány v 60. letech 20. století díky objevu laseru.

Tyto systémy standartně vyžadují pro vytvoření interferenční struktury v celém zorném poli použití koherentních zdrojů osvětlení. Použitím tohoto zdroje se sníží kvalita obrazu možnou přítomností koherentního šumu, parazitních interferencí a difrakcí na hranách optických komponent. Ve srovnání s běžnými optickými mikroskopy dosahují DHM nižšího příčného rozlišení [27]. Na druhou stranu umožňují zobrazování rychlých dějů, a také je zajištěna jejich vysoká odolnost vůči vibracím. Rychlost snímání je tak omezena pouze rychlostí zpracování dat, kterou určují parametry detektoru a počítače. Nespornou výhodou je tedy možnost zobrazovat vzorky (živé buňky) v reálném čase [10, 16]. Dalším pozitivem je jednoduchost konstrukce DHM, protože referenční větev je bez zobrazovací a osvětlovací optiky.

První off-axis holografický mikroskop umožňoval plnou rekonstrukci předmětové vlny pomocí optických metod [28], protože hologram byl zaznamenáván pouze na fotografickou desku, která byla poté vyvolána a osvětlena rekonstruující vlnou. Pokrok ve výpočetní technice a objev digitálních detektorů znamenal vývoj i v oblasti holografie. Vznikla tzv. digitální holografie, ve které je hologram zaznamenán na digitální detektor s CCD nebo CMOS čipem, viz obrázek 2. Světelný svazek jdoucí ze zdroje světla Z_d (laseru) je pomocí děliče svazku D_1 rozdělen do referenční a předmětové větve. V předmětové větvi prochází světlo po odrazu od zrcadla Z_1 kondenzorem K , pozorovaným vzorkem VZ a objektivem O . Referenční větev neobsahuje žádnou osvětlovací ani zobrazovací optiku. Světelné svazky z obou větví jsou potom díky děliči svazku D_2 opět složeny a výsledný hologram je zaznamenán na kameru K .

K rekonstrukci fáze vlny se využívá počítač, a proto vznikl první digitální holografický mikroskop až díky vývoji výkonného hardwaru [29], což vedlo ke zjednodušení a zrychlení celého procesu. Rekonstrukce předmětové vlny se provádí pomocí rychlých Fourierovských metod. Hologram je převeden na spektrum prostorových frekvencí, ve kterém je dobře oddělitelné spektrum interferenčních proužků. Toto spektrum je vybráno a váženo Hanningovou funkcí k potlačení artefaktů vzniklých rychlou Fourierovou transformací. Výsledné spektrum je převedeno zpětnou rychlou Fourierovou transformací a tím získána komplexní amplituda rekonstruované předmětové vlny. Z té je možno vypočítat jak intenzitu vlny, tak i její nenavázanou fázi, ze které lze získat QPI.

Metoda DHM, stejně jako ostatní metody kvantitativního fázového kontrastu, umožňuje kvantitativní pozorování živých buněk a zároveň, na rozdíl od metod fluorescenčních, je i neinvazivní [30]. Vady zhoršující kvalitu výsledného fázového kontrastu koherentním šumem a parazitními interferencemi je možné odstranit použitím světla s nízkou časovou a prostorovou koherencí. Toho lze dosáhnout použitím achromatického interferometru DHM mikroskopu, nebo připojením externího modulu ke klasickému světelnému mikroskopu. Těmito moduly jsou například moduly π -interferometr [31] nebo wDPM modul (z angl. White Light Diffraction Phase Microscopy) [32]. Obě techniky využívají interferometr, v jehož jedné větvi dochází k filtrování prostorových obrazových frekvencí tak, že je získána referenční větev, která neobsahuje obrazové informace.



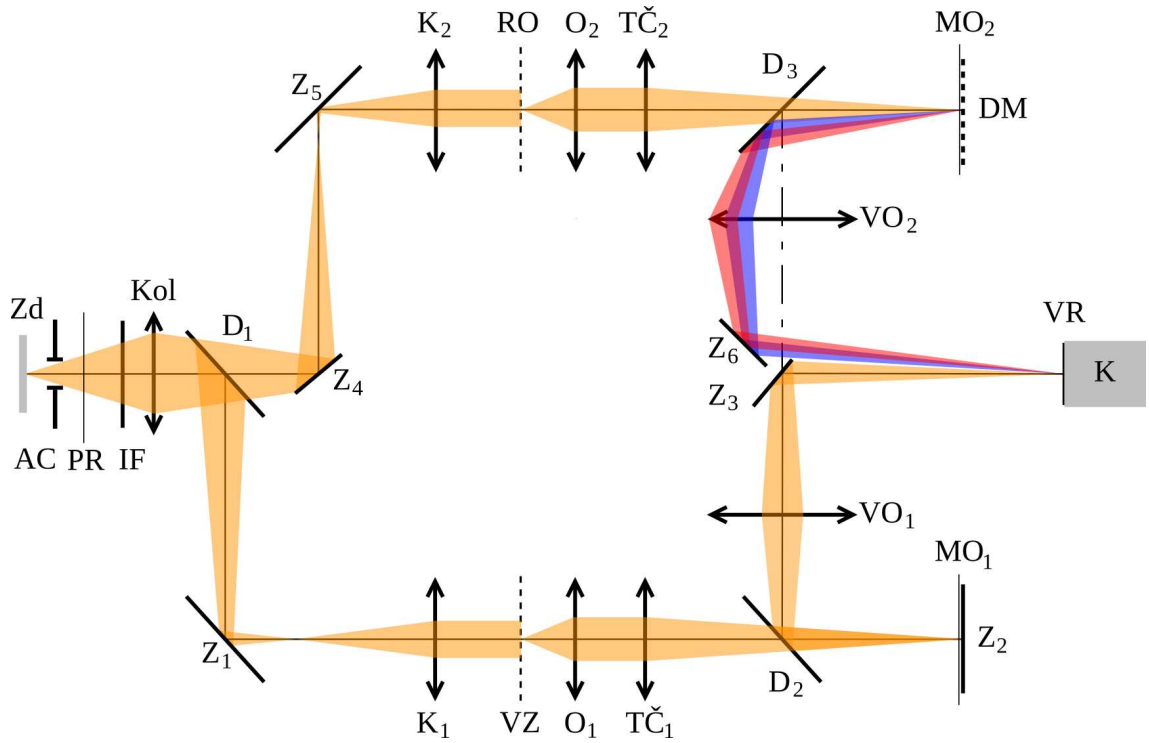
Obrázek 2: Schéma digitálního holografického mikroskopu. Zd - zdroj světla, $D_{1,2}$ - děliče svazku, $Z_{1,2}$ - zrcadla, Kon - kondenzor, VZ - vzorek, O - objektiv, K - kamera. Převzato z [29].

1.3.1 Koherencí řízená holografická mikroskopie

Holografické mikroskopy využívající zdroje světla s nízkou časovou a prostorovou koherencí se nazývají Koherencí řízené holografické mikroskopy (zkr. CCHM, z angl. Coherence-Controlled Holographic Microscope). Jsou založeny na principu nekoherentní off-axis holografie a vznikly na FSI VUT. CCHM umožňuje kvantitativní fázové zobrazování i velmi rychlých dějů, silně potlačuje koherentní šum a parazitní interference. Zajišťuje také možnost využít efektu koherenční brány k zobrazování v difuzních prostředích [27, 33]. Příčné rozlišení mikroskopu je srovnatelné s konvenčními optickými mikroskopy. Pomocí vhodného nastavení koherence osvětlení je možné přizpůsobovat tyto vlastnosti zobrazení požadavkům experimentu [10].

V nynější době je na fakultě umístěn CCHM druhé generace, který využívá difrakční mřížku DM umístěnou v referenční větvi, na rozdíl od CCHM první generace, kde byla umístěna mřížka jako dělič svazku do předmětové a referenční větve. Optické schéma mikroskopu druhé generace je zobrazeno na obrázku 3. Interferenční struktura je současně zobrazením struktury difrakční mřížky DM a proto je možné ji vytvořit i nekoherentním světlem [27, 34, 35].

Zdrojem světla pro CCHM je halogenová lampa, ze které je světlo vedeno světlovodem do roviny zdroje Zd, kde vzniká plošný polychromatický zdroj světla. Po průchodu kolektorem Kol je světelný svazek rozdělen pomocí děliče D_1 a zrcadel $Z_{1,4,5}$ do dvou větví, předmětové a referenční. Rovina zdroje Zd je pomocí kolektoru Kol zobrazena do zadních ohniskových rovin kondenzorů $K_{1,2}$. Tím jsou zajištěny podmínky pro vznik Köhlerova osvětlení [36]. To znamená, že referenční objekt RO i vzorek V jsou nasvíceny rovnoměrně a s největší možnou intenzitou světla. Polní rovina PR je kolektorem Kol a kondenzory



Obrázek 3: Optická sestava CCHM. Zd - zdroj světla, AC - aperturní clona, PR - polní rovina, IF - interferenční filtr, Kol - kolektor, D_{1-3} - děliče svazků, Z_{1-6} - zrcadla, $K_{1,2}$ - kondenzory, VZ - vzorek, RO - referenční objekt, $O_{1,2}$ - objektivy, $TČ_{1,2}$ - tubusové čočky, $MO_{1,2}$ - roviny meziobrazů vzorku, DM - difrakční mřížka, $VO_{1,2}$ - výstupní objektivy, VR - výstupní rovina, K - detektor (CCD kamera). Převzato z [30].

$K_{1,2}$ promítnuta do roviny vzorku V a referenčního objektu RO. Tyto roviny jsou pomocí objektivů $O_{1,2}$ a tubusových čoček $TČ_{1,2}$ zobrazeny do rovin meziobrazů $MO_{1,2}$, které jsou následně výstupními objektivy $VO_{1,2}$ promítnuty do výstupní roviny interferometru VR. Ve výstupní rovině VR je umístěna CCD kamera, na které je zaznamenáván výsledný hologram. V rovinách meziobrazů $MO_{1,2}$ je v referenční větvi umístěna difrakční mřížka DM a ve větvi předmětové je umístěno zrcátko Z_2 . Pomocí nich je zajištěno, že ve výstupní rovině VR vznikne interferenční obrazec se shodnou prostorovou frekvencí proužků pro všechny body plošného polychromatického zdroje Zd a všechny vlnové délky. Prostorová koherence světla v CCHM je řízena pomocí aperturní clony AC umístěné nedaleko zdroje Zd. Ještě před kolektorem Kol je umístěn interferenční filtr IF, který ovlivňuje časovou koherenci světla [27].

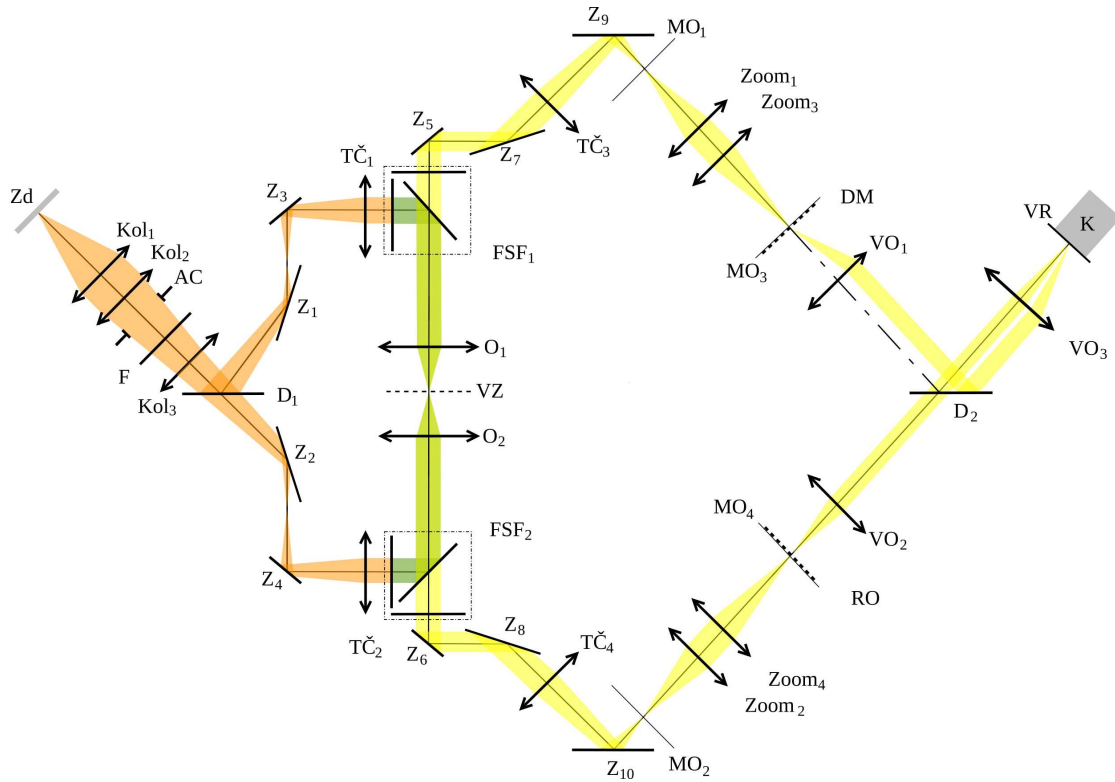
Výsledné obrazy vzniklé při pozorování CCHM se opět zpracovávají pomocí Fourierovských metod. Z hologramu se díky těmto metodám získává intenzitní obraz vzorku, a také informace o fázi. Po navázání skoků v intervalu $(0, 2\pi)$ a vyrovnaní pozadí snímku získáváme QPI [37].

Nevýhodou těchto mikroskopů je vysoká náročnost na nastavení a seřízení mikroskopu, která je dána tím, aby obě větve mikroskopu byly opticky identické. Čím méně koherentní světlo je při zobrazení použito, tím je z důvodu vysoké citlivosti obtížnější nastavení optické délky obou větví, a také je nutné přesné seřízení optických komponent v příčném

směru [30].

1.3.2 Fluorescenční holografická mikroskopie

Důsledkem dalšího vývoje nekoherentní holografie je vznik FHM, tedy Fluorescenčního Holografického Mikroskopu, o kterém pojednává tato část. Jedná se o interferenční systém se speciálním způsobem měření prostorového rozložení indexu lomu, který si nechali patentovat Ing. Pavel Kolman, Ph.D. a prof. RNDr. Radim Chmelík, Ph.D. [38]. Schéma mikroskopu je uvedeno na obrázku 4.



Obrázek 4: Optická sestava FHM. Zd - zdroj světla, F - interferenční filtr, Kol₁₋₃ - kolektory, D_{1,2} - děliče svazků, Z₁₋₁₀ - zrcadla, TČ₁₋₄ - tubusové čočky, FSF_{1,2} - fluorescenční sestavy filtru, O_{1,2} - objektivy, VZ - vzorek, MO₁₋₄ - roviny meziobrazů vzorku, Zoom₁₋₄, DM - difrakční mřížka, RO - referenční okénko, VO₁₋₃ - výstupní objektivy, VR - výstupní rovina, K - detektor (CCD kamera). Převzato z [30].

Mikroskop se skládá ze dvou částí. První z nich je osvětlovací část, která začíná fluorescenční lampou, která je použita jako zdroj světla Zd. Z roviny zdroje prochází světlo skrz kolektory Kol₁₋₃, tubusové čočky TČ_{1,2} a mikroskopové objektivy O_{1,2} do roviny vzorku VZ. Světelný svazek je pomocí děliče D₁ a zrcadel Z₁₋₄ rozdělen do dvou osvětlovacích větví. Šedé filtry F lze využít pro regulaci intenzity osvětlující vlny. Možným vyměňováním fluorescenčních sestav filtrů FSF_{1,2} je pro fluorescenční aplikaci mikroskopu umožněn výběr excitačního a emisního spektra vlnových délek.

Zobrazovací část mikroskopu je stejně jako osvětlovací část rozdělena do dvou větví. V tomto případě nelze určit, která z nich je předmětová a která referenční, protože obě ne-

sou informace o vzorku. Obě větve mají stejnou předmětovou rovinu, ve které je umístěn fluoreskující vzorek VZ. Excitované fluorofory v celé ploše vzorku emitují nekoherentní záření, jež prochází oběma zobrazovacími větvemi. Ve výstupní rovině VR, na detektoru K (CMOS kamera), spolu excitační záření interferuje za vzniku hologramu. V obou zobrazovacích větvích jsou umístěny shodné optické komponenty. Rovina vzorku je zobrazována do rovin meziobrazů $MO_{1,2}$ pomocí mikroskopových objektivů $O_{1,2}$ a tubusových čoček $T\check{C}_{3,4}$. Z těchto rovin je obraz přenesen zoomovacími soustavami $Zoom_{1-4}$ do rovin meziobrazů $MO_{3,4}$, kde je vložena difrakční mřížka DM a referenční okénko RO. Tyto roviny jsou pak zobrazeny výstupními objektivy VO_{1-3} do výstupní roviny VR.

Rekonstrukce obrazu opět vychází z Fourierovských metod. Každý hologram je zpracován již popsáním postupem. Intenzitní obraz tvoří u FHM mikroskopu konfokální řez vzorkem. Nasnímá-li se soustava hologramů v různých hloubkách vzorku VZ, lze z amplitudy rekonstruovat obdobný 3D model vzorku jako u konfokálního mikroskopu. Navíc lze využít rozdíly nenavázané fáze mezi jednotlivými snímky k tomu, aby se dalo určit rozložení indexu lomu v objemu vzorku. Lze takto získat obdobné zobrazení jako v tomografii.

Nevýhodou tohoto mikroskopu je opět vysoká náročnost na nastavení a seřízení. Jak je ukázáno v [30], kvalita rekonstruovaných dat je přímo závislá na kvalitním seřízení mikroskopu. Větve mikroskopu musí být opticky identické a optické komponenty musí být správně usazené ve svých teoretických polohách.

2 Cíle práce

Optické mikroskopy jsou základními nástroji nejen v buněčné biologii, ale téměř ve všech oborech. Správné vyladění vzájemných poloh jednotlivých optických prvků, neboli justáž, je klíčové pro správnou funkci i toho nejjednoduššího mikroskopu. Pokud není používaný mikroskop správně seřízen, nejsou získaná obrazová data kvalitní. Proto je nutné před uvedením do provozu každý přístroj seřídit. Obzvláště pro CCHM a FHM mikroskop je tento požadavek extrémně důležitý. Z tohoto důvodu je potřeba vytvořit justážní kolimátor, tedy pomůcku, díky které bude možné správně seřídit veškeré optické komponenty v mikroskopu. Při vytváření kolimátoru je nutné naplnit tyto cíle diplomové práce:

- 1) Stanovit požadavky na justážní kolimátor a jeho optické parametry.
- 2) Vytvořit konstrukční návrh justážního kolimátoru včetně výrobní dokumentace.
- 3) Navrhnout detektor záměrného obrazce včetně měřicího softwaru.
- 4) Vytvořit metodiku justážního postupu a otestovat justážní kolimátor s detektorem záměrného obrazce.

3 Vytyčování přímek

Metoda vytyčování přímek se v současné době běžně využívá v oborech a aplikacích, kde je nutné zajistit vysokou přesnost měřicích či kontrolních prací, což je např. ve stavebnictví, geodézii a zbrojním průmyslu.

Optické možnosti vytyčení přímky se dělí na dvě metody: dalekohledové a laserové. V případě dalekohledové metody je přímka určena body, jejichž obrazy jsou promítány do téhož bodu záměrné osnovy v polní rovině dalekohledu. V poslední době se dalekohledová metoda využívá například v oblasti průmyslu pro zaměřovače střelných zbraní, pušek a luků [39–42]. Při laserové metodě je vysílán laserový svazek do měřicího prostoru a přímka je určena body, do kterých se promítá tentýž bod přístroje. Může být také využita difrakční maska vložená do určité vzdálenosti od laseru a body přímky pak určují středy difrakčního obrazce v kterékoli vzdálenosti od masky. Laserové metody jsou použitelné i za zhoršených světelných podmínek či za tmy (v noci, v temných uzavřených prostorech, v dolech apod.), zatímco dalekohledové metody v těchto případech použít nelze [43].

Pro náš případ je vhodnější použití laserové metody, proto se tato práce bude hlouběji zabývat právě touto metodou. Laserové metody jsou přehledně zpracovány v dizertační práci pana Velechovského [44].

3.1 Současné laserové metody vytyčování přímek

3.1.1 Metody využívající prostého svazku

Z počátku se využívalo vhodné vlastnosti prostého laserového svazku. Jeho výhodou je možnost transformace, malá divergence a dobrá viditelnost středu stopy. Jedná se především o gaussovský svazek s příčným modem rozložení intenzity TEM_{00} a TEM_{11} . Při použití TEM_{00} modu je laserový svazek fokusován do místa detekce. Využije-li se běžně dostupných objektivů s malou stavební délkou tubusu, začne se rozměr stopy od určité vzdálenosti postupně zvětšovat. To je nevýhodné, protože tím pozvolna klesá přesnost v určení středu stopy, tedy i přímky, která je tímto středem určena. Přesto je metoda vyhovující pro většinu prací v oblasti stavebnictví [44].

Při použití TEM_{11} modu je jako bod přímky definován průsečík dvou kolmých přímek nulové intenzity. Chyba stanovení středu stopy je u obou modů stejná a pohybuje se kolem jedné desetiny až dvacetiny průměru stopy [45].

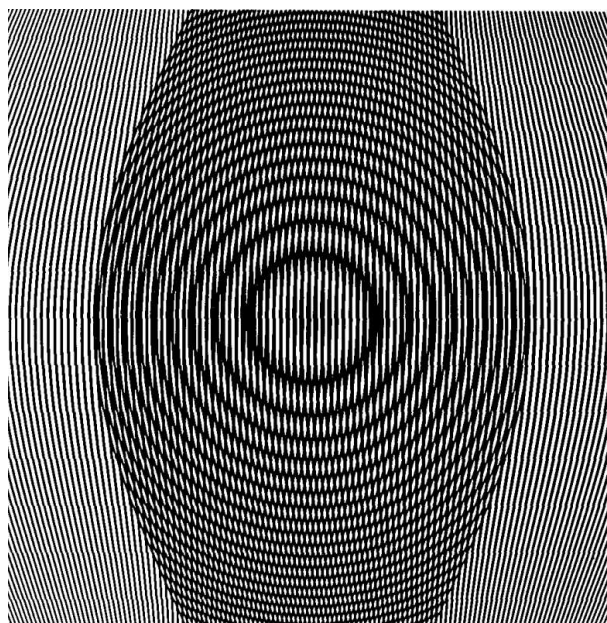
3.1.2 Difrakční metody vytyčování přímek

Jedná se o laserové metody, u kterých je navíc použit difrakční člen (mřížka, nebo filtr). Využívá se především Fresnelovy difrakce. Vhodný difrakční člen je možné umístit přímo do optického systému laseru, do laserového svazku, nebo může být součástí optiky vyhodnocovacího zařízení [46].

Jako difrakční členy se používají zonální mřížky (difraktivní čočky a pravoúhlé lineární mřížky), ekvidistantní kruhové mřížky a fázové filtry.

Pro vytyčování přímek se v praxi používaly Soretovy mřížky, Woodovy mřížky nebo varifokální moiré zonální mřížky. Zonální mřížky tvoří mezikruží, jejichž poloměry jsou v poměru odmocnin přirozených čísel. Pokud se nepropustná a propustná mezikruží střídají, světlo prochází pouze sudými, nebo pouze lichými zónami a nedochází ke změně fáze světla. Jedná se o Soretovy mřížky. Jestliže jsou všechna mezikruží propustná a mezi sousedními mezikružími dochází ke změně fáze o π , mluvíme o Woodově mřížce (tj. Soretova modifikovaná mřížka). Za těmito difraktivními čočkami (zonálními mřížkami) je možné pozorovat Fresnelovu difrakci s rotační symetrií, která je tvořena soustřednými tmavými a světlými kroužky.

Je možné použít i varifokální zonální mřížku, která je dalším typem zonální mřížky a tvoří ji dvě na sebe položené skleněné planparalelní destičky se speciálním typem mřížky, viz obrázek 5. Překryvem a posunutím planparalelních destiček v horizontální ose vzniká zonální mřížka. Na rozdíl od Soretovy mřížky se propustnost zón tohoto typu mřížek nemění skokově, ale postupně [47, 48].



Obrázek 5: Varifokální zonální mřížka. Převzato z [47].

Také se používají ekvidistantní kruhové mřížky, které jsou tvořeny propustnými a nepropustnými mezikružími, které jsou ohraničeny kružnicemi s poloměry v poměru přirozených čísel. Difrakční obrazce ve tvaru soustředných světlých a tmavých kroužků vznikají v libovolné vzdálenosti za mřížkou a jejich středy leží na vytyčované přímce. Fresnelovu difrakci na ekvidistantní kruhové mřížce poprvé podrobně popsali M. Liška a V. Boček, kteří společně navrhli a otestovali první mobilní laserový difrakční zaměřovač, u něhož byla mřížka vložena přímo do optického systému laseru. Zaměřovač byl sestaven pro účel vytyčování přímek ve velkém rozsahu vzdáleností [43, 49].

Případně lze použít i pravoúhlou zonální mřížku, která je v podstatě Soretovou mřížkou v pravoúhlé podobě a má také fokusační účinky. Tvoří ji zóny ve tvaru proužků, které jsou na sebe kolmé a jejich hz šířky jsou v poměru odmocnin z přirozených čísel. Střídají se zóny

propustné a nepropustné. Difrakční obrazec, vznikající v ohnisku mřížky, je tvořen dvěma na sebe kolmými přímkami maximální intenzity. Jejich průsečík je bodem vytyčované přímky. Tento typ mřížky byl použit např. v článku [50] pro ustavení lineárního urychlovače částic.

Doposud popsané metody využívaly k vytyčování přímky maximální intenzitu difrakčního obrazce. Existují také metody, ve kterých se využívá přímek s nulovou intenzitou k přesnějšímu měření [51–54]. H. D. Betz [51] vytvořil fázový filtr, za kterým vznikl tmavý záměrný kříž odpovídající difrakčnímu jevu s nulovou intenzitou podél dvou na sebe kolmých přímek. Takový difrakční obrazec bylo možné získat použitím dvou na sebe kolmých propustných polorovin posouvajících fázi světla o π . Pomocí něj lze ustavit na krátké vzdálenosti centrováný prvek s chybou menší než 0,01 mm.

Ve zmiňovaných dokumentech se autoři zabývali především Fresnelovou difrakcí na aperturou neomezeném filtru a pozorovali tedy jevy, kterým odpovídá velký počet propuštěných Fresnelových zón. Pokud ale fázový filtr omezíme otvorem o konečné velikosti, začne se výrazně měnit struktura difrakčního obrazce, a to v závislosti na malém počtu propuštěných Fresnelových zón. Počet těchto zón závisí na experimentálním uspořádání, tj. na vzdálenosti pozorovatele a zdroje s fázovým filtrem, na typu osvětlovací vlny, vlnové délce použitého světla a na geometrii prostorového filtru [44, 53].

3.1.3 Další metody vytyčování přímek

Mezi další metody vytyčování přímek patří např. ty, které využívají optických vad, jako je otvorová vada, nebo používají optický prvek ve tvaru rotačního kužele, neboli axikonu [44, 55, 56].

V práci [44] je jako další způsob vytyčování přímek popsána metoda založená na Fresnelově difrakci na kvadrantovém filtru, který má stejnou amplitudovou propustnost, ale jeho sousední kvadranty mění fázi procházejícího světla o π rad. Difrakční obrazec je tvořen dvěma přímkami nulové intenzity, které jsou na sebe kolmé a vytváří tak uprostřed stínítka černý záměrný kříž (dále jen záměrný kříž). Takovéto Fresnelovy difrakční obrazce vznikající za filtrem jsou velmi kontrastní a v různých vzdálenostech od masky se nemění jejich charakteristika, ale pouze velikost. Záměrný kříž je tedy dobře viditelný v jakékoli vzdálenosti od difrakčního filtru.

Tato metoda má oproti doposud používaným metodám vytyčování přímek menší chybu stanovení polohy středu difrakčního obrazce. Hodnota úhlové chyby se pohybuje kolem 0,2'' (ve vzdálenostech mezi 100 m a 1000 m) [44].

Z dosud popsaných metod se jako nejlépe vyhovující našim požadavkům jeví laserová metoda s Fresnelovou difrakcí na kvadrantovém kruhovém filtru, jehož sousední kvadranty posouvají vůči sobě fázi světla o π . Jako zdroj je použita světelná vlna s gaussovským rozložením intenzity, která je ovlivněna sférickou vadou kolimační čočky. Navržený kolimátor je možné použít při osvitu rovinnou vlnou, Gaussovským svazkem, nebo Besselovským svazkem.

4 Návrh kolimátoru

Kvalita seřízení je naprosto kritická u holografických mikroskopů CCHM i FHM. Pokud by nebyly přesně nastaveny, jejich kvalita zobrazení bude mnohem horší, než jakého jsou schopny. Proto je potřeba pro oba tyto mikroskopy vytvořit přesný justážní kolimátor. Také je důležité neopomíjet pečlivé provedení justážního postupu mikroskopu, než na něm začneme provádět jednotlivá měření.

4.1 Optický návrh

Jako první jsem vytvořila optický návrh kolimátoru, který je zobrazen na obrázku 7(a). Optický návrh je vytvořen podle postupu popsáno v předchozí části. Poté je možné řešit mechanické uložení jednotlivých optických prvků a kolimátoru jako celku.

Kolimátor bude fungovat ve dvou modech. První mod bude využívat jako zdroj světla laserovou diodu pro vystředění optických prvků, viz obrázek 7(b). Ve druhém modu bude využita výbojka jako zdroj polychromatického světla. Tento zdroj simuluje běžné osvětlení ve FHM a umožňuje nám tak správné zaostření optiky v zobrazovací části FHM, a také CCHM mikroskopu, viz obrázek 7(c).

Jako primární zdroj světla pro první mod je použita laserová dioda s optickým jednomodovým vláknem, tvořící bodový zdroj Z_d . Návrh je vytvořen pro světlo o vlnové délce 405 nm, protože součástí FHM jsou dichroická zrcadla, která je nutné správně seřídit. Bylo zjištěno, že tato zrcadla odráží světlo kolem vlnové délky 400 nm. Z nabídky firmy Thorlabs [57] jsem tedy vybrala takovou laserovou diodu, jejíž vlnová délka se nejvíce blíží hodnotě 400 nm. Jedná se o komplet diody a optického vlákna LP405-SF10 s výkonem až 10 mW. Vláknem je zakončeno FC/PC konektorem a jeho numerická apertura $NA_v = 0,12$. Světlo prochází kolimační čočkou K s ohniskovou vzdáleností 25 mm, která přemění rozbíhavý svazek na svazek kolimovaný o průměru cca 12 mm, tj. svazek rovnoběžný s optickou osou. Jako kolimační čočku K byl použit triplet TC25FC-405 od firmy Thorlabs s numerickou aperturou $NA_k = 0,25$, který je najustován na používanou vlnovou délku. Světelná vlna potom pokračuje k fázové masce M , která je vyrobena ze sklíčka o průměru $d_M = 12,7$ mm (tj. $1/2''$), tloušťce $t = 3$ mm. Materiál masky M je sklo typu UV Fused Silica (tavený křemen) jehož index lomu pro 405 nm činí $n = 1,470$. Sklíčko KS bylo pořízeno také od firmy Thorlabs a je označeno jako WG40530. Při průchodu světla maskou M dochází k Fresnelově difrakci. Pomocí zrcadla Z_1 je světlo odraženo a přivedeno do příruby mikroskopu PM . Dalším světelným zdrojem kolimátoru pro druhý mod je polychromatické světlo P , které je po odrazu od dvou šikmých zrcadel Z_2 a Z_1 , upevněných pod úhlem 45° vůči optické ose, taktéž přivedeno do příruby mikroskopu PM . Zdrojem polychromatického světla je halogenová lampa Fiber-Lite DC-950 od firmy Dolan-Jener Industries [58]. Optické prvky, tubus T a zrcadla $Z_{1,2}$ jsou pohyblivé pro změnu modů a pro justáž kolimátoru, viz části 4.3 a 4.5.

Použitá kruhová difrakční maska je rozdělena do čtyř kvadrantů, které mají stejnou amplitudovou propustnost, ale sousední kvadranty posouvají fázi světla o $\Delta\varphi = \pi$ rad. Tohoto posunu je dosaženo díky změně tloušťky masky Δt ve dvou protilehlých kvadrantech.

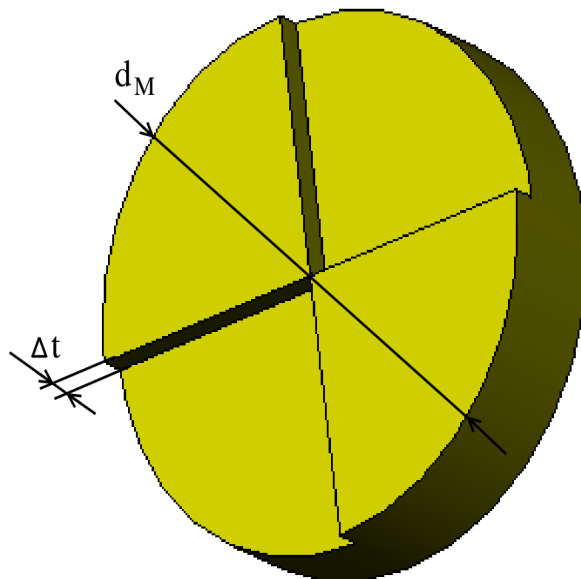
K výpočtu její velikosti využijeme následujícího vztahu:

$$\Delta\varphi = \frac{2\pi}{\lambda}\Delta t(n(\lambda) - 1), \quad (1)$$

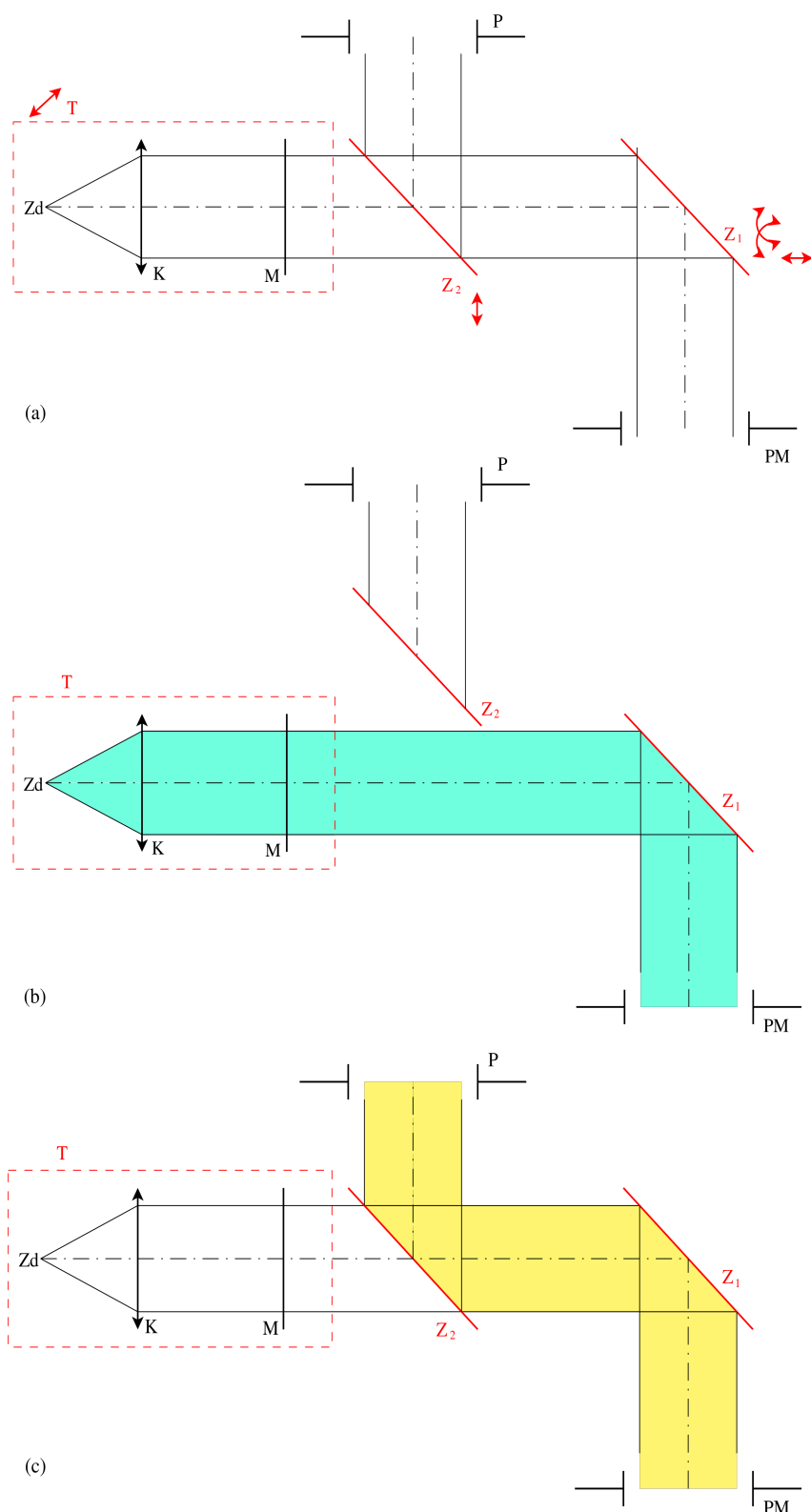
kde λ je vlnová délka použitého světla, $n(\lambda)$ značí index lomu difrakční masky a 1 je index lomu okolního prostředí, v našem případě vzduchu. Když za změnu fáze $\Delta\varphi$ dosadíme hodnotu π rad, odvodíme ze vztahu 1 výraz pro změnu tloušťky:

$$\Delta t = \frac{\lambda}{2(n(\lambda) - 1)}. \quad (2)$$

Pokud dosadíme hodnoty $\lambda = 405$ nm a $n(\lambda) = 1,470$, vyjde nám hodnota změny tloušťky $\Delta t = 0,431$ μm . Na obrázku 6 je zachycen návrh masky.



Obrázek 6: Návrh difrakční masky M z programu SolidWorks: d_M - průměr masky M, Δt - změna tloušťky masky M.



Obrázek 7: (a) Optické schéma kolimátoru: Zd - zdroj světla (laserová dioda), K - kolimační čočka, M - difrakční fázová maska, T - tubus, $Z_{1,2}$ - pohyblivá zrcadla, P - zdroj bílého (polychromatického) světla, PM - příruba mikroskopu. Pozn.: Červenou barvou jsou znázorněny pohyby konkrétních prvků pro justáž zaměřovače. (b) První mod: Laserový mod kolimátoru s difrakční maskou a zdrojem o vlnové délce $\lambda = 405$ nm. (c) Druhý mod: Mod pro justáž obrazových rovin mikroskopu s využitím polychromatického osvětlení.

4.2 Simulace difrakčního obrazce

Rozložení intenzity v difrakčním obrazci má čtyřčetnou, a také zrcadlovou symetrii. Černý záměrný kříž vytvořený přímkami s nulovou intenzitou je dobře viditelný v jakékoli vzdálenosti od difrakční masky [44, 52, 53]. Pro potřeby ověření správné funkce zaměřovače je nutné prověřit, jakou velikost a tvar bude mít záměrný kříž v difrakčním obrazci v různých vzdálenostech při vytyčování optické osy na FHM a CCHM a potažmo i při justáži samotného kolimátoru. Rozsah délek, ve kterých bude docházet k detekci záměrného kříže je cca od 50 do 1000 mm. Proto je nutno provést simulaci difrakčních obrazců. Za odvození následujících vztahů děkuji panu prof. RNDr. Jiřímu Komrskovi, CSc.

Vlnová funkce $\psi(\rho, \varphi, z)$ difraktovaného svazku nechť je dána difrakčním integrálem v paraxiální aproximaci a v polárních (válcových) souřadnicích, viz [59] vztah 5.8 (1):

$$\begin{aligned} \psi(\rho, \varphi, z) = & -\frac{ik}{2\pi} \frac{\exp\left[ik\left(z + \frac{\rho^2}{2z}\right)\right]}{z} \times \\ & \times \int_0^\infty \int_0^{2\pi} \psi_0(\rho_M, \varphi_M) \exp\left\{\frac{ik}{2z}\left[\rho_M^2 - 2\rho_M \cos(\varphi_M - \varphi)\right]\right\} \rho_M d\varphi_M d\rho_M, \end{aligned} \quad (3)$$

kde ρ a φ jsou polární souřadnice ve vzdálenosti z stínítka, k je vlnové číslo, ρ_M a φ_M jsou polární souřadnice v rovině masky M a kde člen $\psi_0(\rho_M, \varphi_M)$ je funkce propustnosti masky M, viz [44] vztah 3.2.2 (19), která byla rozšířena vztahem $\text{circ}\left(\frac{\rho_M}{\rho_0}\right)$, který nám masku omezí jejím poloměrem ρ_0 . Výsledný vztah je ve tvaru:

$$\psi_0(\rho_M, \varphi_M) = \frac{4}{\pi} \sum_{l=0}^{\infty} \frac{\sin[2(2l+1)\varphi_M]}{2l+1} \text{circ}\left(\frac{\rho_M}{\rho_0}\right). \quad (4)$$

Předpokládáme-li dopadající rovinnou vlnu, pak vyjádříme vlnovou funkci podílem difraktované vlny vůči vlně rovinné. Vytknou-li se z vnitřního integrálu v něm nezávislé proměnné, dostaneme vztah:

$$\begin{aligned} \frac{\psi(\rho, \varphi, z)}{\psi_r} = & -\frac{ik}{2\pi z} \exp\left(i\frac{k\rho^2}{2z}\right) \int_0^\infty \exp\left(\frac{ik\rho_M^2}{2z}\right) \rho_M \text{circ}\left(\frac{\rho_M}{\rho_0}\right) \times \\ & \times \int_0^{2\pi} \frac{4}{\pi} \sum_{l=0}^{\infty} \frac{\sin[2(2l+1)\varphi_M]}{2l+1} \exp\left[-\frac{ik}{z}\rho_M \rho \cos(\varphi_M - \varphi)\right] d\varphi_M d\rho_M. \end{aligned} \quad (5)$$

Funkce $\text{circ}\left(\frac{\rho_M}{\rho_0}\right)$ omezuje horní mez vnějšího integrálu. Pak můžeme vztah přepsat do tvaru:

$$\begin{aligned} \frac{\psi(\rho, \varphi, z)}{\psi_r} = & -\frac{ik}{2\pi z} \exp\left(i\frac{k\rho^2}{2z}\right) \int_0^{\rho_0} \exp\left(\frac{ik\rho_M^2}{2z}\right) \rho_M \times \\ & \times \int_0^{2\pi} \frac{4}{\pi} \sum_{l=0}^{\infty} \frac{\sin[2(2l+1)\varphi_M]}{2l+1} \exp\left[-\frac{ik}{z}\rho_M \rho \cos(\varphi_M - \varphi)\right] d\varphi_M d\rho_M. \end{aligned} \quad (6)$$

Tento výraz je možno následně upravit a zavedením substituce $\rho_M = \rho_0 t$, kvůli které je nutné provést přepočítání mezi vnějším integrálem. Také je provedena záměna pořadí sčítání sumy a integrace:

$$\begin{aligned} \frac{\psi(\rho, \varphi, z)}{\psi_r} = & -\frac{2ik\rho_0}{\pi^2 z} \exp\left(i\frac{k\rho^2}{2z}\right) \int_0^1 \exp\left(\frac{ik\rho_0^2}{2z}t^2\right) t \sum_{l=0}^{\infty} \frac{1}{2l+1} \times \\ & \times \int_0^{2\pi} \exp\left[i2(2l+1)\varphi_M - \frac{ik}{z}\rho_0 t \rho \cos(\varphi_M - \varphi)\right] d\varphi_M d\rho_0. \end{aligned} \quad (7)$$

Zavedeme-li Fresnelovo číslo N do předchozího vztahu, tak po úpravách dostáváme vztah:

$$\begin{aligned} \frac{\psi(\rho, \varphi, z)}{\psi_r} = & -\frac{4iN}{\pi} \exp\left(i\pi N \frac{\rho^2}{\rho_0^2}\right) \int_0^1 \exp(iN\pi t^2) \sum_{l=0}^{\infty} \frac{1}{2l+1} \times \\ & \times \int_0^{2\pi} \exp\left[i2(2l+1)\varphi_M - i2\pi N \frac{\rho}{\rho_0} t \cos(\varphi_M - \varphi)\right] d\varphi_M dt, \end{aligned} \quad (8)$$

kde N je již zmíněné Fresnelovo číslo, pro které platí vztah:

$$N = \frac{\rho_0^2}{\lambda z} = \frac{k\rho_0^2}{2\pi z}, \quad (9)$$

viz [60], vztah 3.6 (13). Podle [59] vztah B.13 (6) se dá vnitřní integrál vyjádřit pomocí Besselovy funkce:

$$\begin{aligned} & \int_0^{2\pi} \exp\left[i2(2l+1)\varphi_M - i2\pi N \frac{\rho}{\rho_0} t \cos(\varphi_M - \varphi)\right] d\varphi_M = \\ & = -2\pi \exp[i2(2l+1)\varphi] J_{2(2l+1)}\left(2\pi N \frac{\rho}{\rho_0} t\right). \end{aligned} \quad (10)$$

Po dosazení a úpravě dostaneme:

$$\begin{aligned} \frac{\psi(\rho, \varphi, z)}{\psi_r} = & i8N \exp\left(i\pi N \frac{\rho^2}{\rho_0^2}\right) \sum_{l=0}^{\infty} \exp(iN\pi t^2) \int_0^1 \frac{\sin[2(2l+1)\varphi]}{2l+1} \times \\ & \times J_{2(2l+1)}\left(2\pi N \frac{\rho}{\rho_0} t\right) t dt. \end{aligned} \quad (11)$$

Pro numerické simulace využijeme pouze sumu $S(\rho, \varphi, N)$ z předchozího vztahu, protože členy stojící před ní jsou pro daný výpočet konstantní. Sumu je potřeba ještě upravit kvůli využívané výpočetní knihovně. Jedná se o sumu Hankelových transformací. HANKEL, knihovna Pythonu, dokáže počítat Hankelovy transformace pouze s integrály, které mají

neomezenou horní mez, viz [61]. Proto byla tato mez upravena a integrál byl omezen funkcí $\text{circ}(t)$. Sumu Hankelových transformací $S(\rho, \varphi, N)$ lze zapsat vztahem:

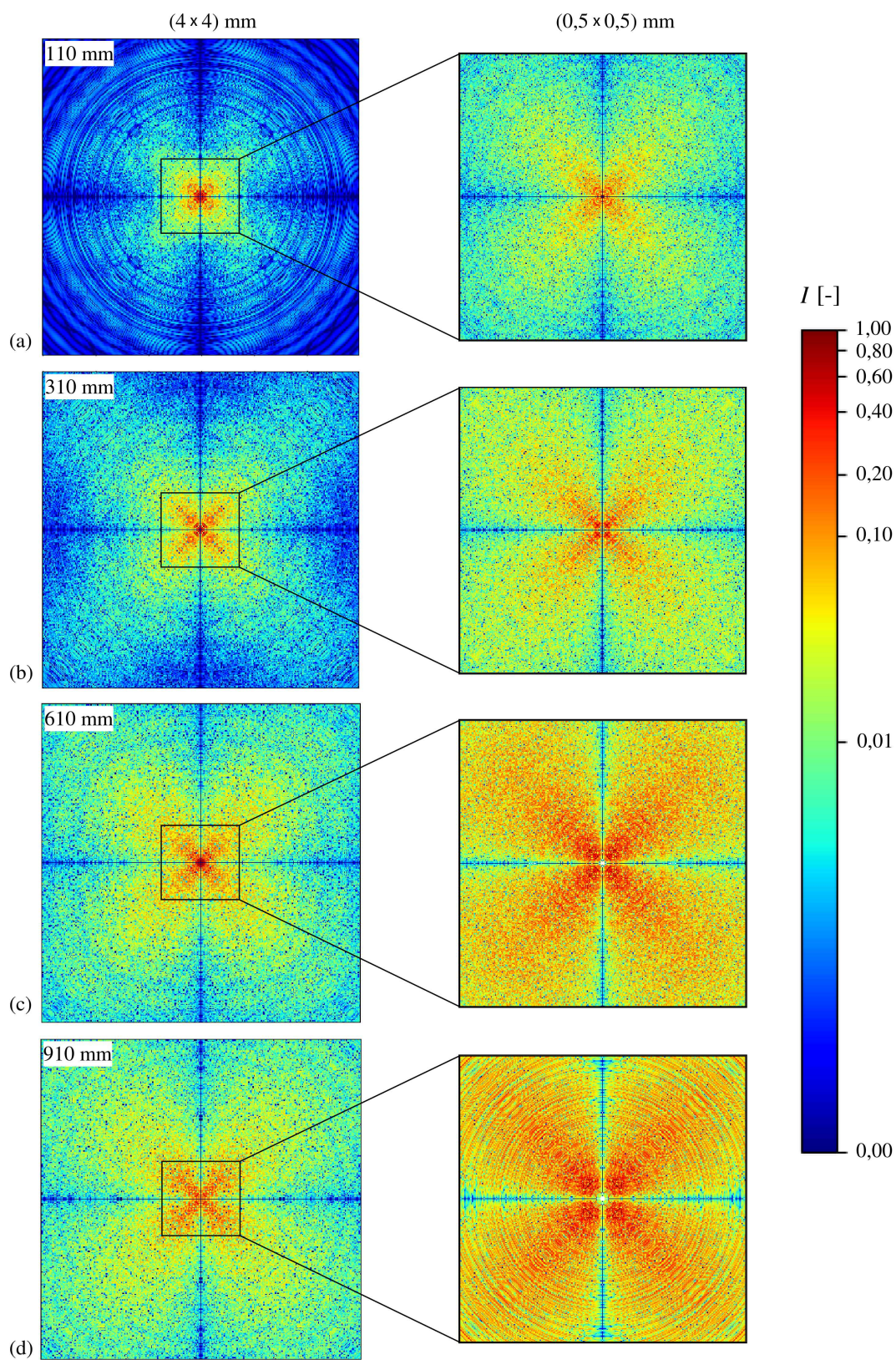
$$S(\rho, \varphi, N) = \sum_{l=0}^{\infty} \frac{\sin[2(2l+1)\varphi]}{2l+1} \int_0^{\infty} \exp(iN\pi t^2) \text{circ}(t) J_{2(2l+1)}\left(2\pi N \frac{\rho}{\rho_0} t\right) t dt. \quad (12)$$

Ze simulací získaných hodnot je spočten kvadrát a hodnoty jsou následně normovány. Výsledná intenzita $I(\rho, \varphi, N)$ je dána vztahem:

$$I(\rho, \varphi, N) = \frac{S(\rho, \varphi, N)^2}{S(\rho, \varphi, N)_{max}^2}, \quad (13)$$

kde $S(\rho, \varphi, N)_{max}^2$ je maximální hodnota prvků z matice kvadrátu sumy $S(\rho, \varphi, N)^2$.

Výsledky simulací jsou zachyceny na obrázku 8. Levý sloupec tvoří stínítka o velikosti (4×4) mm. V pravé části jsou zvětšeny detaily středů difrakčního obrazce, protože ty jsou objektem našeho největšího zájmu. Obrázky vpravo odpovídají velikosti stínítka $(0,5 \times 0,5)$ mm. První řádek, obrázek 8(a), zachycuje Fresnelův difrakční obrazec ve vzdálenosti 110 mm od difrakční masky. Druhý, obrázek 8(b), je vypočítán pro vzdálenost 310 mm stínítka od masky. Třetí řádek, obrázek 8(c), odpovídá vzdálenosti 610 mm a na posledním obrázku 8(d) je zachycena difrakční struktura na stínítku ve vzdálenosti 910 mm od masky.

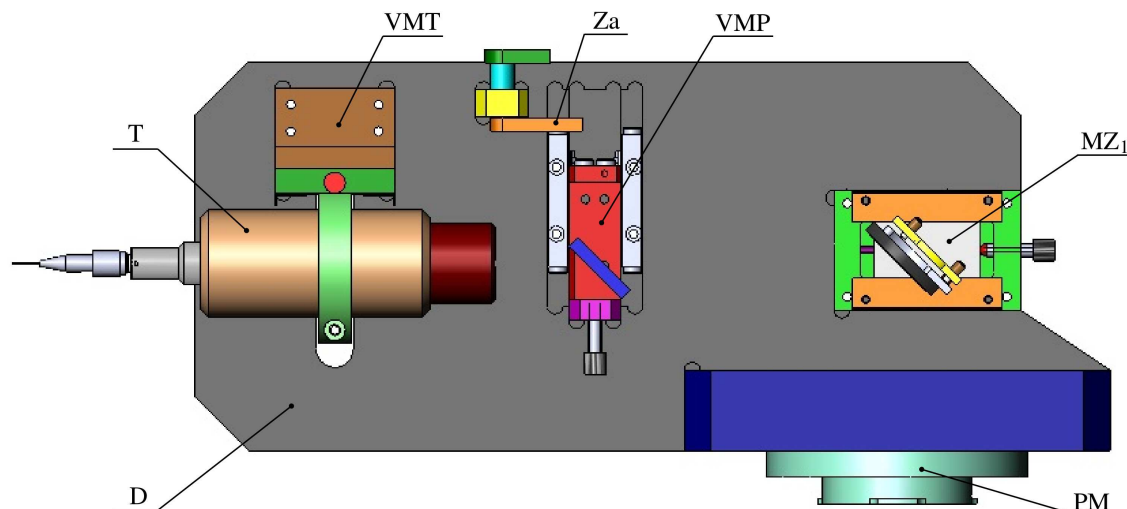


Obrázek 8: Výsledek simulace rozložení normované intenzity $I(\rho, \varphi, N)$ pro jednotlivé vzdálenosti stínítka od difrakční masky. (a) 110 mm (b) 310 mm (c) 610 mm (d) 910 mm.

4.3 Konstrukční návrh

Aby bylo možné dobře využít všechny možnosti optických prvků a systému jako takového, je nutné jejich vhodné usazení do mechaniky, a to tak, aby se s danými komponentami dalo pohybovat podle potřeby, viz naznačené pohyby v obrázku 7. Dalším důležitým úkolem je mechanická ochrana těchto součástí, protože některé optické komponenty jsou náchylné na poškrábání či zničení, pokud se s nimi nezachází opatrně.

Na základě optického návrhu kolimátoru byl tedy vytvořen i návrh konstrukční, který je uveden na obrázku 9. Celý systém je upevněn na tuhé základní desce D, na níž jsou

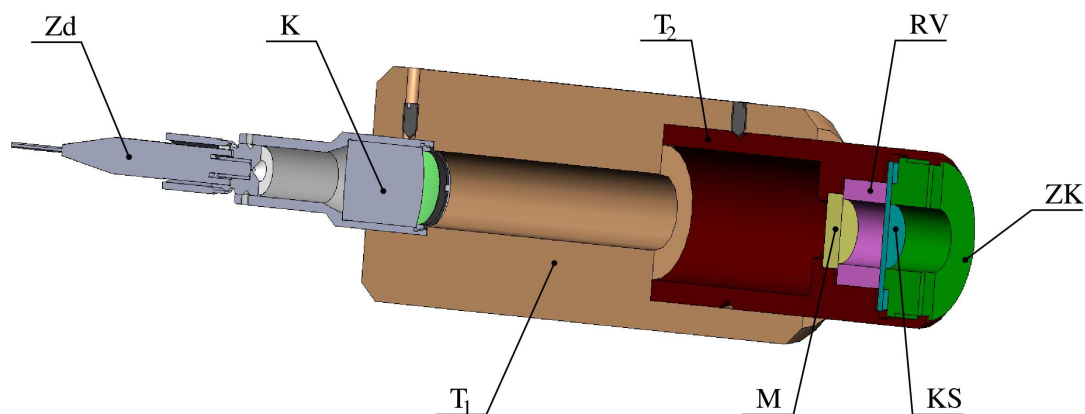


Obrázek 9: Konstrukční návrh. D - základní deska, T - tubus, VMT - výsuvný mechanismus tubusu, Za - závora, VMP - výsuvný mechanismus polychromatického osvětlení, MZ₁ - mechanismus zrcadla Z₁, PM - příruba mikroskopu.

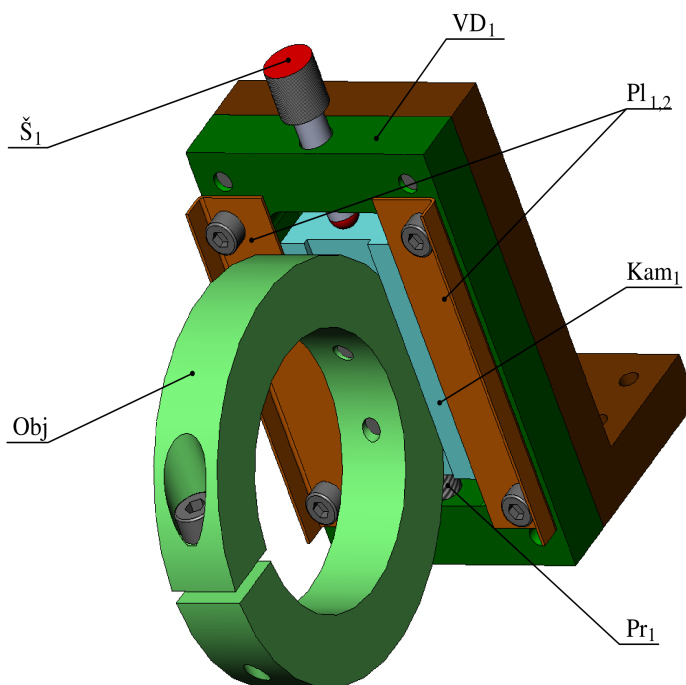
usazeny jednotlivé podsestavy. Prvním z nich je tubus T s jeho výsuvným mechanismem VMT. Další mechanismus je VMP, tj. výsuvný mechanismus polychromatického osvětlení, který slouží pro zavádění přídatného polychromatického osvětlení do systému kolimátoru. A posledním mechanismem MZ₁ se ustavuje poloha a náklon zrcadla Z₁ pro zavedení světla obou modů do mikroskopu.

V tubusu T jsou uloženy všechny důležité optické komponenty, které jsou tím chráněné proti mechanickému poškození. Podrobnější schéma tubusu T je vidět na obrázku 10. Tubus T kolimátoru se skládá ze dvou částí T_{1,2}, které jsou k sobě připevněny pomocí drážky a stavěcího šroubu. Konec optického vlákna Zd, které je vedené od laserové diody je připevněno pomocí FC/PC konektoru ke kolimační čočce K kolimátoru. Kolimační čočka K je pomocí stavěcího šroubu připevněna k tubusu T₁. Do tubusu T₁ je vložen a pomocí drážky a stavěcího šroubu zajištěn tubus T₂. Masky M spolu s krycím sklíčkem KS, které ji chrání proti mechanickému poškození, jsou uloženy v tubusu T₂. Vzdálenost mezi oběma optickými prvky je ustavena rozpěrným válcem RV. Vložené komponenty jsou zajištěny v tubusu T₂ závitovým kroužkem ZK. Celý tubus T je uchycen do objímky Obj, s níž se dá pohybovat ve směru kolmém k optické ose optických komponent osazených v tubusu T, viz obrázek 11. Celý tubus T je nesen lineárním výsuvným mechanismem tubusu

VMT, který funguje v rozsahu ± 4 mm. Kámen Kam_1 , ke kterému je šrouby připevněna objímka Obj tubusu T , je upevněn v drážce vodící desky VD_1 pomocí bronzových planžet $Pl_{1,2}$ s předpružením. Rozměry kamene Kam_1 jsou voleny v poměru 1,5:1 (délka:šířka), aby nedocházelo k přičení kamene Kam_1 v drážce vodící desky VD_1 . Šroub \check{S}_1 s jemným závitem působí proti pružině Pr_1 , která zajišťuje zpětný chod kamene Kam_1 v drážce VD_1 . Stoupání použitého šroubu \check{S}_1 je voleno jako jemné - 0,5 mm. Pokud je to nutné, lze kámen Kam_1 zaaretovat v konkrétní vyhovující pozici přitažením šroubů u planžet $Pl_{1,2}$.

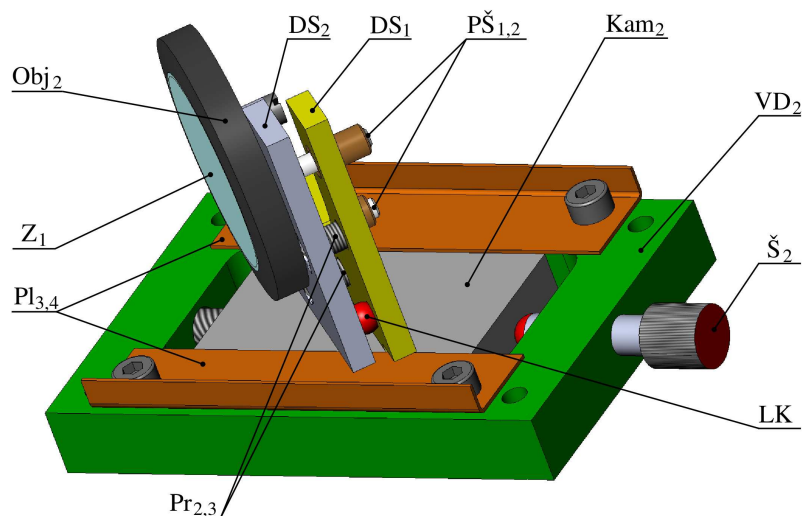


Obrázek 10: Tubus T . Zd - zdroj světla, K - kolimátor, $T_{1,2}$ - části tubusu, M - difrakční maska, RV - rozpěrný válec, KS - krycí sklíčko, ZK - závitový kroužek.



Obrázek 11: Výsuvný mechanismus tubusu VMT. \check{S}_1 - šroub s jemným stoupáním, Obj - objímka tubusu, VD_1 - vodící deska kamene, $Pl_{1,2}$ - planžety, Kam_1 - kámen, Pr_1 - pružina.

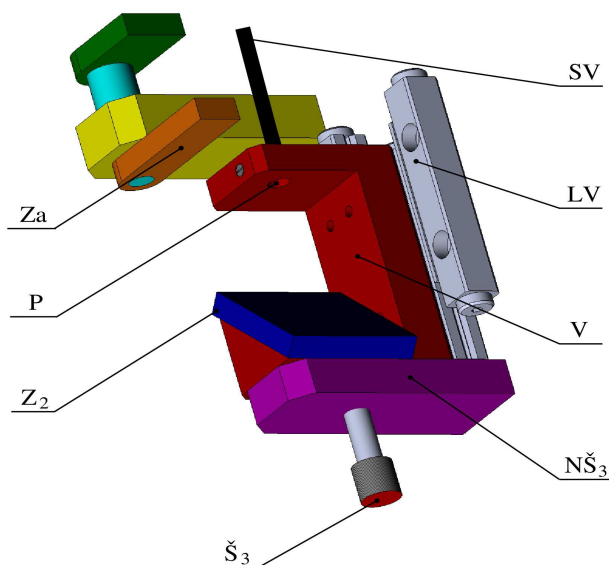
Další podsestavou je mechanismus MZ_1 umožňující lineární pohyb a dvouosý náklon zrcadla Z_1 , viz obrázek 12. Zrcadlo Z_1 o průměru 26,4 mm zakoupené od firmy Thorlabs je umístěno v manipulačním systému pomocí dvou šroubů typu M2. Lineární posuv je řešen shodně jako u tubusu T a je kvůli jemnému stoupání justážního šroubu \check{S}_2 velmi přesný. Dvouosý náklon je zajištěn díky konstrukci manipulačního systému, který využívá tříbodového kinematického uložení, jež umožňuje náklon kolem dvou vzájemně kolmých os v maximálním rozsahu $\pm 5^\circ$. Tříbodové uložení je zajištěno vložení ložiskové kuličky LK o průměru 4 mm v kuželových dírách mezi dvěma deskami stolku $DS_{1,2}$. Náklony desky DS_2 můžeme měnit pomocí dvou přesných šroubů s kulovým koncem $P\check{S}_{1,2}$. Šrouby $P\check{S}_{1,2}$ s výrobním názvem F2D5ES10 spolu se závitovými pouzdry F2D5ESN1P jsou zakoupeny od firmy Thorlabs. V desce DS_2 jsou v místech dotyku šroubů $P\check{S}_{1,2}$ vyrobeny dvě zahhloubení. V jednom z nich jsou uloženy dva kalené kolíky tak, že kulový konec šroubu $P\check{S}_1$ se dotýká jejich válcových ploch. Ve druhém zahhloubení desky DS_2 pro hlavu šroubu je vložena tenká nerezová podložka, aby se snížil kontaktní tlak na desku stolku DS_2 od šroubu $P\check{S}_2$. Tímto kinematickým uložením jsou odebrány čtyři z celkem šesti možných stupňů volnosti. Mezi deskami stolku $DS_{1,2}$ jsou uloženy dvě pružiny $Pr_{2,3}$ s předpětím, které svojí silou působí proti šroubům $P\check{S}_{1,2}$ a zajišťují tak celistvost stolku. Deska DS_1 manipulačního systému je usazena v kameni Kam_2 , se kterým je možné pohybovat jako s celkem v předozadním směru. Kámen Kam_2 je zadržen ve vodící desce VD_2 díky planžetám $Pl_{3,4}$. Zrcadlo Z_1 je vůči optické ose kolimátoru nakloněno o 45° a musí být nastaveno tak, aby světlo na něm odražené prošlo do mikroskopu přesně středem mikroskopové příruby MP.



Obrázek 12: Manipulační systém zrcadla Z_1 . Z_1 - zrcadlo, $DS_{1,2}$ - desky stolku, $P\check{S}_{1,2}$ - přesné šrouby, Kam_2 - kámen, VD_2 - vodící deska kamene, \check{S}_2 - šroub s jemným stoupáním, LK - ložisková kulička, $Pr_{2,3}$ - pružiny s předpětím, $Pl_{3,4}$ - planžety.

Poslední ručně ovládaný výsuvný mechanismus VMP slouží pro zavedení polychromatického osvětlení P do kolimátoru, viz obrázek 13. Zdroj, halogenová lampa Fiber-Lite DC-950, je umístěna mimo kolimátor a pomocí světlovodu SV je světlo přivedeno

do kolimátoru. Konec světlovodu SV je pomocí stavěcího šroubu upevněn v horní části vozíku V, který je umístěn na lineárním vedení LV zakoupeném od firmy SKF [62] s označením LWR3050-KIT. Lineárním vedením LV lze posouvat díky válcovým valivým elementům, které jsou umístěny mezi jednotlivými díly lineárního vedení LV a umožňují pohyb s vozíkem V až o ± 13 mm. Ve spodní části vozíku V je pod úhlem 45° umístěno zrcadlo Z_2 , které zavádí polychromatické osvětlení P do optické dráhy kolimátoru. Zrcadlo Z_2 , které je k vozíku V přilepeno, bylo odříznuto a zabroušeno do požadovaných rozměrů ze skladového kusu. Po odraze od zrcadla Z_2 pokračuje světelná vlna k zrcadlu Z_1 a přírubě mikroskopu PM stejným způsobem jako v prvním případě při použití laserového modu kolimátoru. V ose lineárního vedení LV je v základní desce D kolimátoru pomocí dvou šroubů typu M3 upevněn nosič šroubu $N\check{S}_3$ pro šroub \check{S}_3 s jemným stoupáním. Ten zajišťuje přesné nastavení koncové polohy zrcadla Z_2 . Pokud chceme místo polychromatického osvětlení využívat laserové, stačí uchopit vozík V a ručně s ním posunout po lineárním vedení LV. Nad lineárním vedením LV je umístěna závora Za, se kterou lze otáčet v rozmezí $\pm 95^\circ$ kolem její osy a tou je možné zadržet vozík V tak, aby nebránil průchodu laserového světla optickou dráhou kolimátoru. Závora je sestavena ze tří k sobě lepených částí.



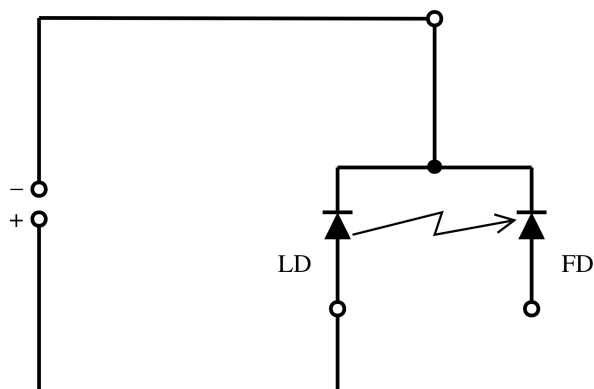
Obrázek 13: Připojení polychromatického osvětlení: Z_2 - zrcadlo, P - polychromatické osvětlení, Za - závora, SV - světlovod, LV - lineární vedení, V - vozík, $N\check{S}_3$ - nosič šroubu \check{S}_3 , \check{S}_3 - šroub s jemným stoupáním.

Jako příruba mikroskopu PM byla použita stávající příruba, která byla pouze upravena, aby se k ní dala pomocí čtyř šroubů typu M8 připevnit základní deska D kolimátoru.

Všechny popsané nekupované neoptické součásti, až na planžety $Pl_{1,2}$ a šrouby s jemným stoupáním \check{S}_{1-3} , jsou vyrobeny z hliníkové slitiny AW 2030.

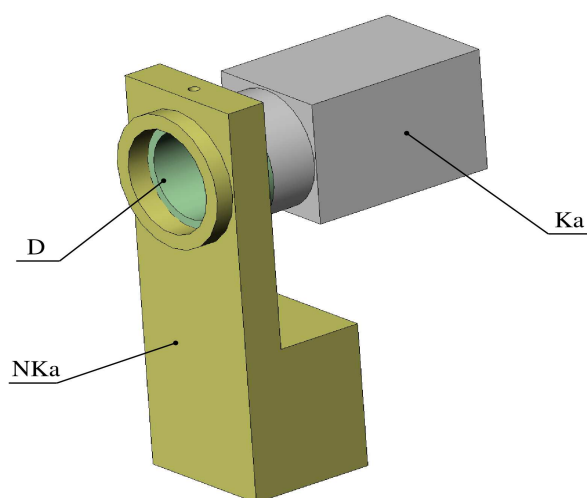
Všechny mechanické součásti byly buď vyrobeny, nebo upraveny ze stávajících dílů a smontovány. Jako celek je kolimátor mechanicky funkční. Správnost mechanického návrhu kolimátoru byla ověřena díky justáži, viz část 4.5. Dané komponenty vzájemně líčují a navržené pohyby mají dostatečný rozsah pro správné nastavení kolimátoru.

Laserová dioda LD, zdroj monochromatického záření, je napájena díky zapojení do elektrického obvodu, ve kterém je maximální elektrické napětí 5 V. Zapojení laserové diody LD je schématicky znázorněno na obrázku 14. Fotodioda FD, která slouží pro zpětnou regulaci výkonu laseru, využita nebyla.



Obrázek 14: Schéma zapojení zdroje pro laserový mod kolimátoru: LD - laserová dioda, FD - fotodioda.

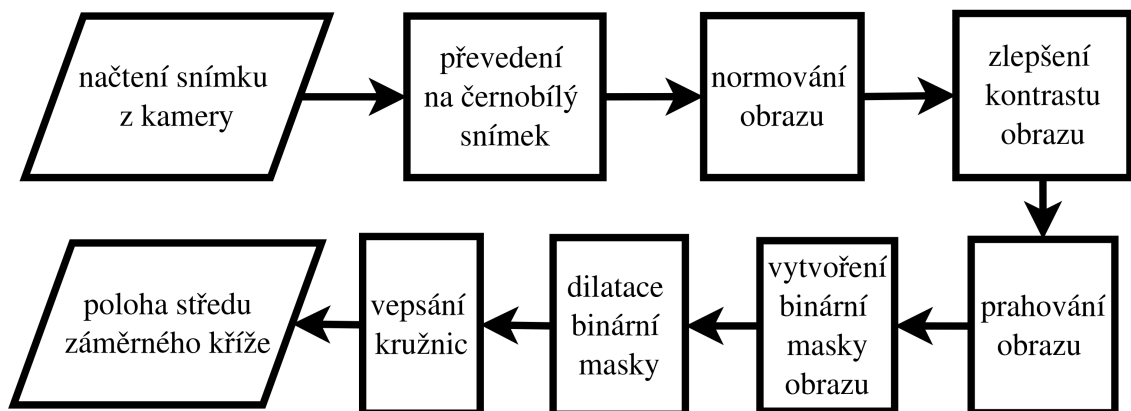
Dále byl vytvořen justážní přípravek s kamerou, viz obrázek 15. Pro záznam obrazu jsme použili běžnou kameru Ka s přípojným závitem typu C-Mount a s datovým rozhraním USB. Pro nosič kamery NKa jsme využili stávajícího dílu, který byl pouze upraven. Kamera Ka je zašroubována do držáku kamery D, ve kterém je drážka a do nosiče NKa je upevněn pomocí stavěcího šroubu zapadajícího do drážky. Kamera Ka byla vybrána od firmy Basler [63] pod obchodním názvem Basler ace acA2040-90uc.



Obrázek 15: Justážní přípravek s kamerou Ka: NKa - nosič kamery, D - držák kamery, Ka - kamera.

4.4 Software pro detekci záměrného kříže

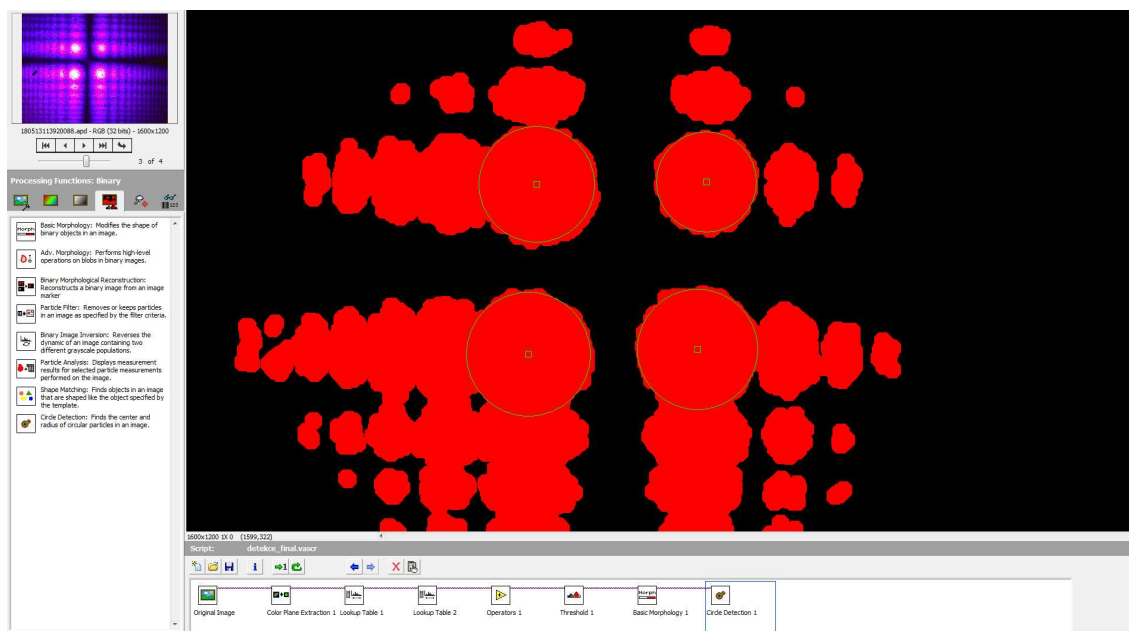
Pro vlastní experiment a pro pozdější používání kolimátoru je nutno vytvořit software pro detekci záměrného kříže v prostředí LabView. K tomu bylo nejdříve nutné vytvořit metodiku detekce záměrného kříže ve vývojovém prostředí Vision builderu za využití metod analýzy obrazu. Tato metodika je znázorněna vývojovým diagramem na obrázku 16.



Obrázek 16: Schéma metodiky zpracování obrazu ve Vision Builderu.

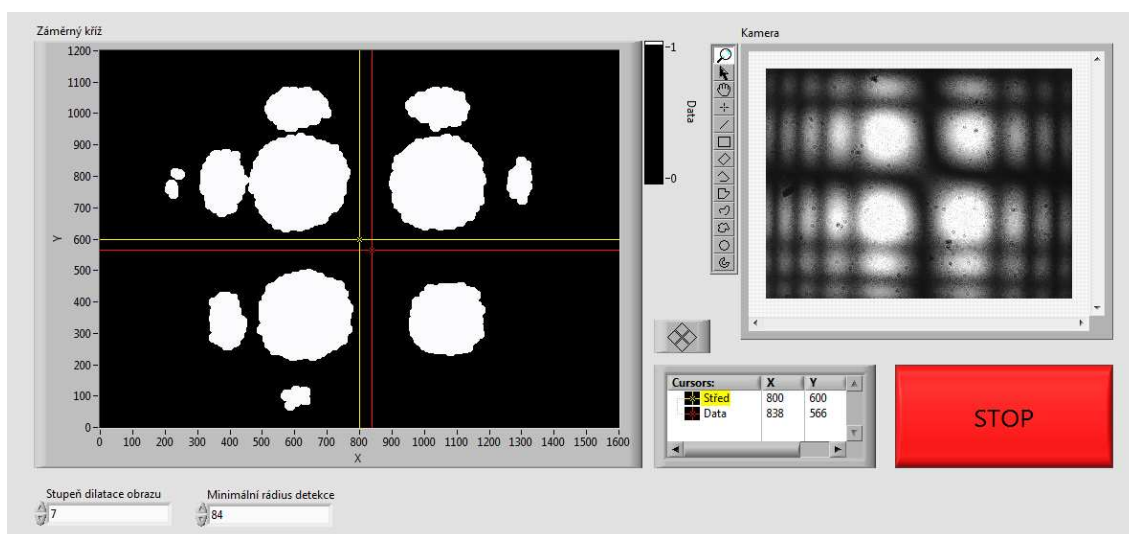
Vstupem je kamerou zachycený snímek záměrného kříže. V prvním kroku je barevný obraz převeden na černobílý. Následně je obraz normován, přičemž dochází k ekvalizaci histogramu obrazu. To znamená, že hodnoty pixelů původního snímku jsou převedeny do hodnot stupňů šedi 0 až 255. Tento krok zajišťuje univerzálnost metodiky, tedy možnost zpracovat obrazy s různými hodnotami intenzity, aniž by se změnil postup a výsledek. Poté je upraven kontrast obrazu tak, aby v něm byla zvýrazněna místa s maximální hodnotou intenzity. V dalším kroku jsou odprahovány nízké hodnoty obrazových pixelů. Výsledek prahování je převeden na binární masku, jejíž pixelová struktura je rozmazána pomocí metody dilatace obrazu. K detekci záměrného kříže je použita metoda detekce kruhů v binárních maskách. Stanoví-li se vhodně hodnoty minim a maxim vepisovaných kružnic, pak jsou v binární masce detekovány polohy čtyř největších oblastí, jež leží v blízkosti středu černého záměrného kříže, viz kružnice v obrázku 17. Poloha záměrného kříže je následně určena průměrem pozic středů čtyř vykreslených kružnic.

Výsledná metodika z prostředí Vision Builder je následně převedena do prostředí LabView. Importované programové schéma bylo rozšířeno o online zachytávání obrazu z kamery. Protože difrakční obrazec má v každé vzdálenosti od difrakční masky stejnou charakteristiku, ale liší se svojí velikostí, mohou se velikosti čtyř středových kruhů měnit. V programu LabView je tedy možné upravovat hodnotu minimální velikosti průměrů kružnic, které budou vepisovány do binární masky, viz obrázek 18. Lze také měnit parametr charakterizující dilataci binární masky. V levé části softwaru je displej vykreslující žlutý kříž, který odpovídá středu CCD čipu kamery. Také je vykreslován červený kříž, který odpovídá středu difrakčního obrazce. V pravé části je online náhled z kamery a tabulka, ve které jsou zapsány číselné hodnoty pozic obou znázorněných křížů. Červené



Obrázek 17: Metodika detekce záměrného kříže v prostředí Vision Builderu.

tlacítko slouží k ukončení softwaru.

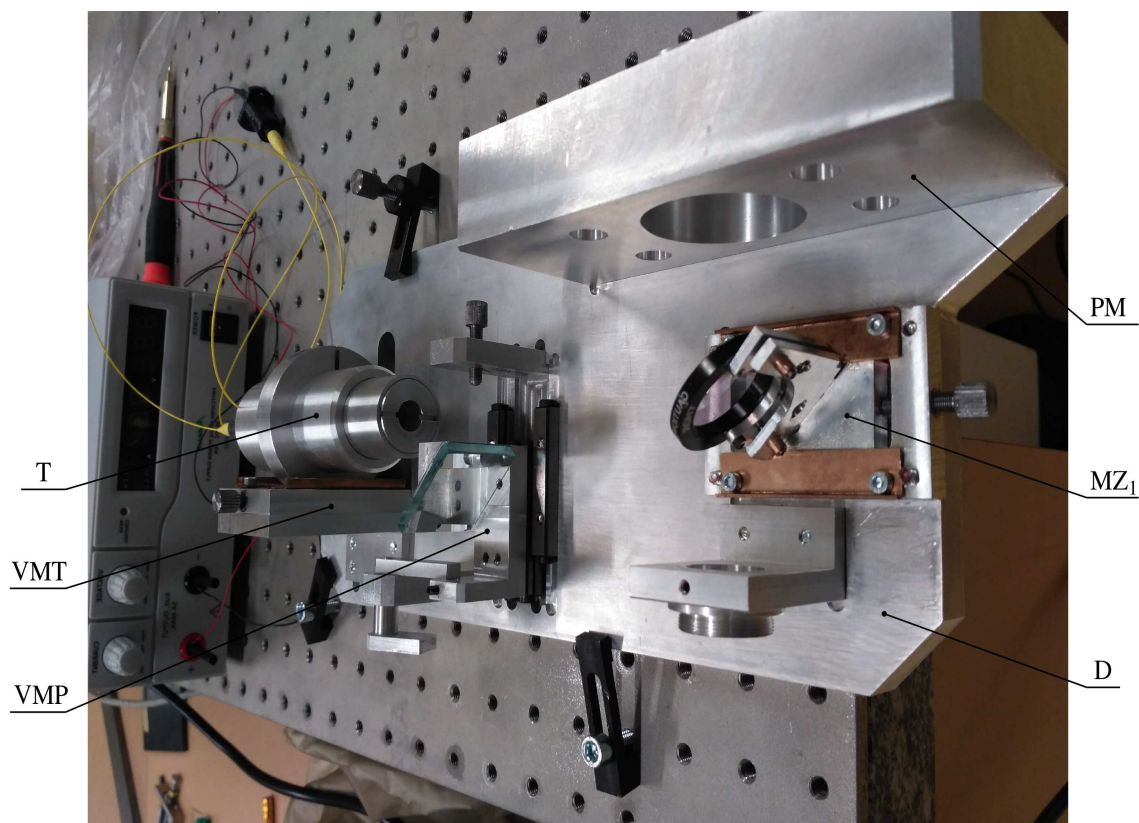


Obrázek 18: Software detekce záměrného kříže v prostředí LabView.

Po převedení algoritmu do prostředí LabView je možné zjistit přesné souřadnice středu záměrného kříže vytvořeného přímkami nulové intenzity na difrakčním obrazci. Lze nejen zjistit přesnou polohu středu difrakčního obrazce (číselně), ale také se do zpracovávaného obrazu vykresluje červený kříž s aktuální pozicí vyhodnoceného středu. Jeho pozici je možné porovnat s křížem žlutým, který zvýrazňuje střed kamery, na kterou je obraz zaznamenáván. Celý algoritmus funguje přímo online, aby bylo možné vidět důsledky posuvu justovaných optických prvků a aby byla jejich centrace co nejrychlejší a nejpresnější.

4.5 Justážní postupy a testování kolimátoru

V této části je popsána justáž samotného kolimátoru a následně i FHM, pro jehož nastavení je kolimátor primárně určen. Kolimátor po sestavení je zobrazen na obrázku 19.



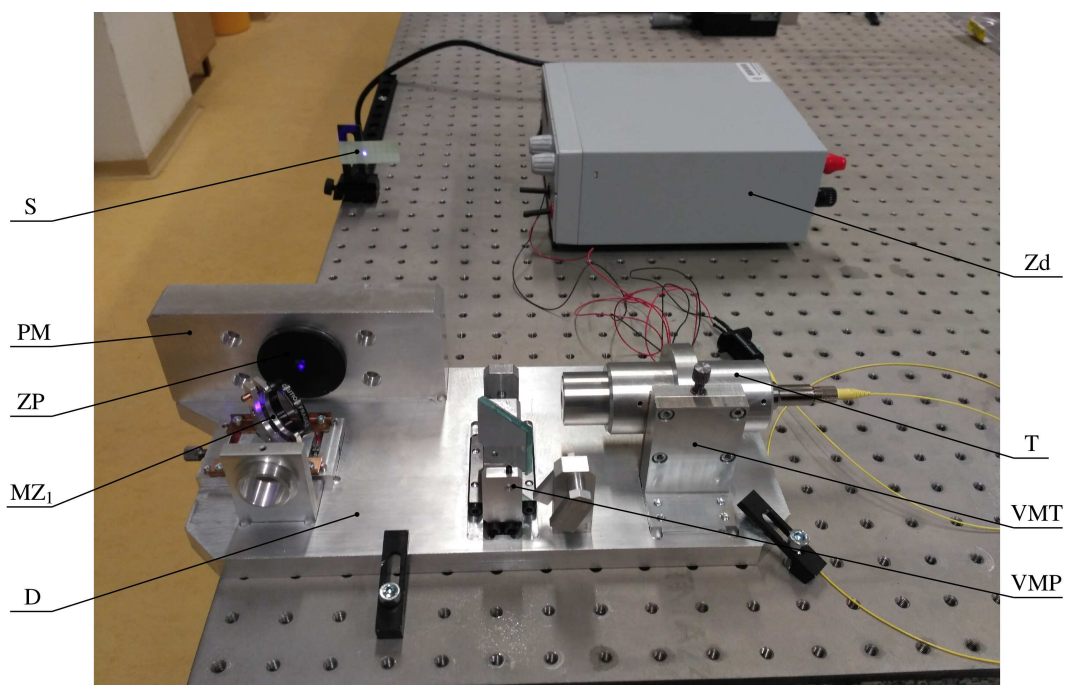
Obrázek 19: Kolimátor po montáži. VMP - výsuvný mechanismus polychromatického osvětlení, VMT - výsuvný mechanismus tubusu, T - tubus, PM - příruba mikroskopu, MZ_1 - mechanismus zrcadla Z_1 , D - základní deska.

4.5.1 Justážní postup kolimátoru

Podle vytvořeného kolimátoru se budou justovat optické komponenty v dalších přístrojích, proto je nutné vysoce přesné ustavení jednotlivých optických komponent vlastního kolimátoru. Tato práce musí být provedena velmi přesně a precizně.

Aby se dal kolimátor považovat za seřízený, musí splňovat dvě následující podmínky. Výstupní svazek musí procházet přesně středem příruby mikroskopu PM a musí vytyčovat přímku kolmou k ploše příruby. Nejdříve je potřeba zajistit, aby svazek vystupující z kolimátoru byl kolmý k ploše příruby PM. Toho dosáhneme především manipulací se zrcadlem Z_1 . Postupným procesem zrcadlo Z_1 lineárně posouváme pomocí jeho lineární části mechanismu MZ_1 a při tom jej pomocí naklápací části mechanismu Z_1 natáčíme. Po každém takovém zásahu je posouváno stínítko S, na kterém je sledována poloha černého záměrného kříže. Poloha záměrného kříže na stínítku S je kontrolována ve dvou vzdálenostech od kolimátoru. Při změně vzdálenosti by se stopa neměla na stínítku S pohybovat.

Poté, co je zajištěno, že svazek vytyčuje kolmou přímku, je možno jej vycentrovat na střed příruby mikroskopu PM. Protože je manipulováno s lineární částí mechanismu MZ_1 zrcadla Z_1 a s tubusem T pomocí výsuvného mechanismu tubusu VMT a je sledována difrakční stopa na stínítku S. Protože průměr mikroskopové příruby PM je v jednotkách centimetrů, využili jsme záměrný přípravek ZP s velmi malým vnitřním průměrem, který byl vložen do příruby mikroskopu PM. Prochází-li světelný svazek středem mikroskopové příruby PM, zkontrolujeme jeho kolmost k rovině příruby PM. V případě potřeby se celý postup opakuje.



Obrázek 20: Justáž kolimátoru. D - základní deska, MZ_1 - mechanismus zrcadla Z_1 , ZP - záměrný přípravek, PM - příruba mikroskopu, S - stínítko, Zd - zdroj, T - tubus, VMT - výsuvný mechanismus tubusu, VMP - výsuvný mechanismus polychromatického osvětlení.

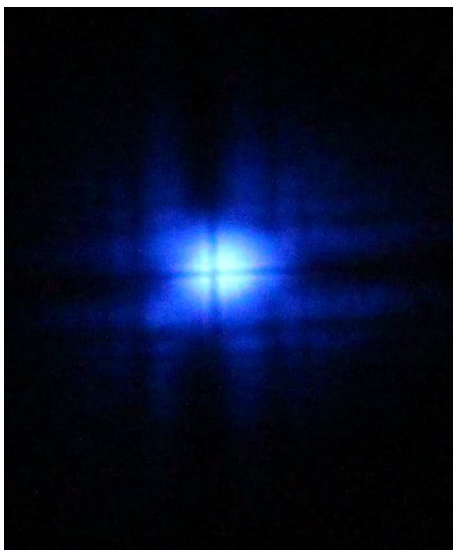
4.5.2 Justážní postup FHM a ověření jeho nastavení

V této části je popsán postup justáže FHM a je testován stav současného nastavení mikroskopu.

Na začátku justáže je FHM složené bez optických prvků. Místo fluorescenční výbojky je k FHM díky své přírubě připevněn kolimátor. Následně jsou zprovozněny obě zdrojová světla kolimátoru, laser i halogenová výbojka. Postupně jsou od strany osvětlení do FHM vkládány odrazné prvky (zrcadla, děliče a dichroická zrcadla) a je justována jejich poloha a náklon. Za každým odrazným prvkem jsou v nosných deskách FHM vytvořeny dva justážní porty, kam lze vložit justážní přípravek s kamerou, viz obrázek 15. Díky detekčnímu softwaru je v každém dostupném justážním portu porovnávána odchylka záměrného kříže od středu čipu kamery. Úpravou polohy a náklonu odrazného prvku je docíleno toho, že jsou středy záměrného kříže a středy čipu kamery pro oba justážní

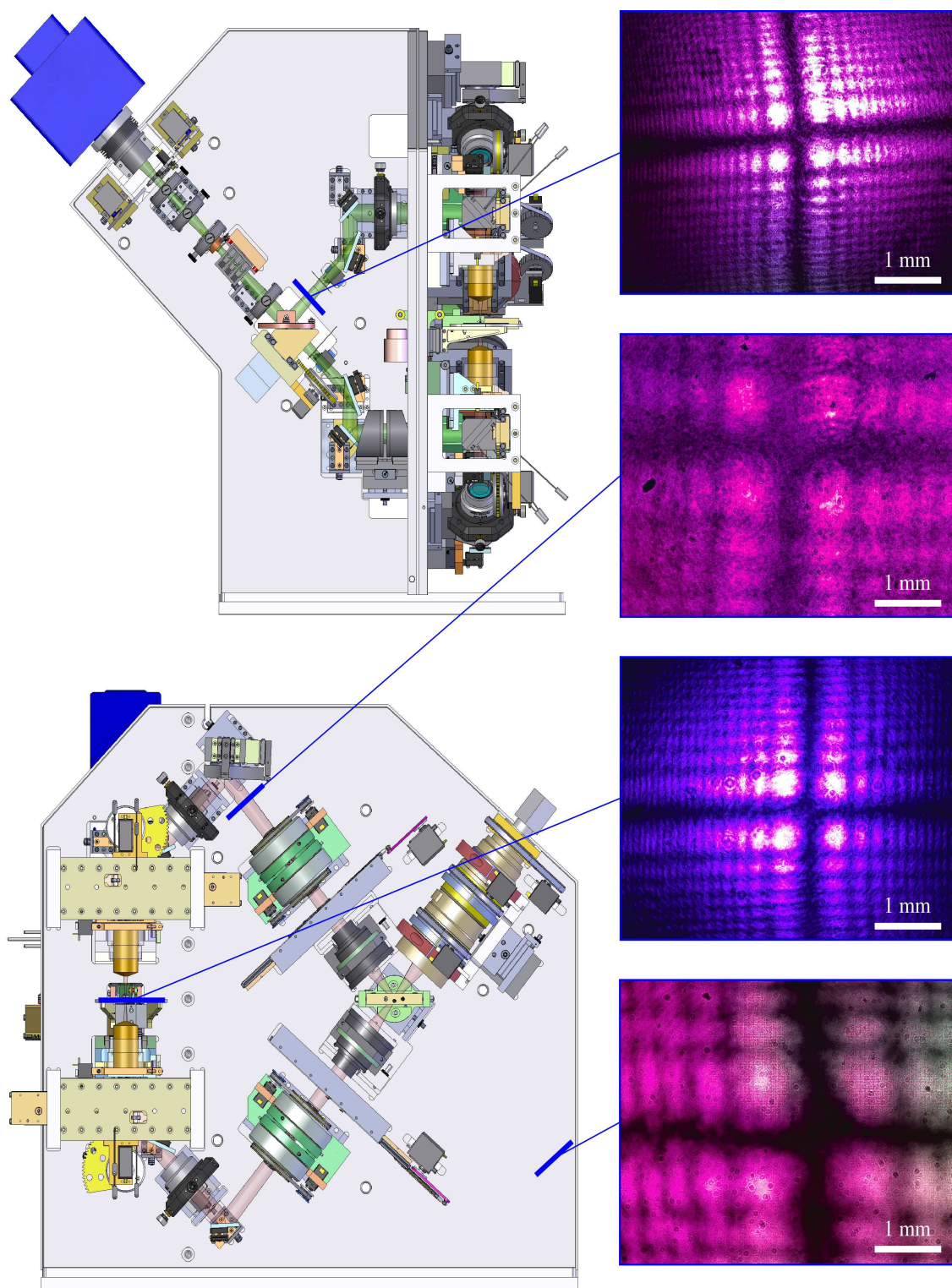
porty totožné. Pak je možné začít justovat další odrazný prvek, dokud není vytyčena celá optická osa FHM.

Jsou-li korektně vytyčeny optické osy mikroskopu, lze osazovat FHM osvětlovací a zobrazovací optikou. Tak jako u odrazných prvků, jsou i tyto prvky středěny na optickou osu mikroskopu. Polohy záměrných křížů jsou detekovány ve dvou justážních portech s justážním přípravkem kamery a jsou sjednocovány se středem čipu kamery. Je-li justována optika zobrazovací soustavy FHM, pak je nutné použít i druhý mod kolimátoru, tedy mod s polychromatickým osvětlením. Do rovin vzorku Vz a rovin meziobrazů MO_{1-4} jsou vkládány již existující tenké amplitudové masky, které jsou při tomto modu nasvětlovány a jsou tak zobrazeny na CMOS čip FHM. Se zobrazovací optikou je osově pohybováno a roviny meziobrazů MO_{1-4} jsou ostřeny na CMOS čip FHM. Po zaostření je důležité provést kontrolu jejich centricity s optickou osou pomocí laserového modu kolimátoru. V případě potřeby je možné kroky centrování a ostřední opakovat.



Obrázek 21: Fotografie záměrného kříže po připevnění justážního kolimátoru na FHM, která byla zachycena na stínítku mezi objektivy $O_{1,2}$. Na obrázku jsou vidět dva černé záměrné kříže, které na sebe navazují.

Justážní kolimátor a současný stav seřízení FHM jsem testovala mezi probíhajícími experimenty, proto nebylo možné FHM rozebrat a otestovat přímo metodiku justáže. Kvalitu současného sjustování FHM je možné vidět na obrázku 21. Obrázek je pořízen mimo rovinu vzorku VZ mezi objektivy $O_{1,2}$ a je možné na něm vidět dva černé záměrné kříže, které se přesně překrývají. Jeden je větší a je patrný na okrajích obrázku, druhý je uprostřed něj. Ramena obou záměrných křížů na sebe navazují. Pohybem stínítka mezi objektivy byla potvrzena vzájemná centricita objektivů $O_{1,2}$. Při tomto pohybu se postupně mění velikosti záměrných křížů. V každém dostupném justážním portu byl pomocí justážního přípravku s kamerou pořízen snímek záměrného kříže, viz obrázek 22. Z jednotlivých snímků je patrné, že záměrný kříž leží ve středu CCD čipu kamery. Z těchto měření lze usoudit, že FHM je v současnosti vhodně seřízen. Justážní postup bude otestován, jakmile bude FHM z důvodu servisu rozebráno.



Obrázek 22: Obrazy záměrného kříže zachycené kamerou FHM v dostupných justážních portech v různých vzdálenostech od difrakční masky a s různým zvětšením daným osvětlovací a zobrazovací optikou FHM. Vlastní justážní porty jsou vyznačeny modrou barvou. Poznámka: Obrazy nasnímány kamerou s čipem o velikosti $1/4''$, která byla momentálně dostupná.

Závěr

Holografické mikroskopy jsou velmi citlivé na nepřesné ustavení optických komponent, proto je justážní kolimátor velkým přínosem pro dosažení kvalitního zobrazování pomocí těchto přístrojů. Výsledkem této práce je navržený a plně funkční justážní kolimátor pro Fluorescenční holografický mikroskop, lze ho ovšem použít i pro seřízení dalších mikroskopů, jako je například Koherencí řízený holografický mikroskop. Justážní kolimátor využívá kruhové difrakční masky, na které dochází k Fresnelově difrakci. Zachycené obrazce jsou charakteristické dvěma na sebe kolmými přímkami nulové intenzity, které vytváří záměrný kříž. Podle tohoto záměrného kříže lze seřídít veškeré optické komponenty vlastního kolimátoru i zmiňovaných mikroskopů. Charakter Fresnelova difrakčního obrazce je v různých vzdálenostech od difrakční masky neměnný, rozdílná je pouze jeho velikost. Proto byly provedeny simulace ověřující tvar záměrného kříže. Pro rychlou a výpočetně nenáročnou detekci záměrného kříže na CCD čipu justážního přípravku byl v prostředí LabView vytvořen měřicí software. Díky němu je možné určit pozice středů záměrných křížů v různých vzdálenostech od difrakční masky. Navrhovaná metodika justážního postupu kolimátoru i Fluorescenčního holografického mikroskopu je založena na dílčích krocích ustavující jednotlivé optické komponenty. Při justážním postupu vlastního kolimátoru je nejdříve nutné zajistit vytyčení laserové přímky a následně přímku seřídít tak, aby procházela středem příruby sloužící pro připojení kolimátoru k mikroskopu. Při justáži Fluorescenčního holografického mikroskopu je nutné začít ustavovat nejprve optické prvky s odraznými povrchy a následně lze ustavit další optické komponenty.

Navržený justážní kolimátor byl vyroben a seřízen. Následně byl otestován na FHM a byla provedena také kontrola justáže mikroskopu. Prakticky tak byla potvrzena vhodnost návrhu justážního kolimátoru včetně detekčního softwaru.

Literatura

- [1] ZERNIKE, F. Phase contrast, a new method for the microscopic observation of transparent objects. *Physica*, ročník 9, č. 7 1942, s. 686–698 ISSN 00318914 Doi: 10.1016/S0031-8914(42)80035-X.
- [2] NOMARSKI, G. Differential microinterferometer with polarised waves. *J. Phys. Radium, Paris*, ročník 16, č. 9 1955, s. 9S–13S.
- [3] HOFFMAN, R., GROSS, L. The modulation contrast microscope. *Nature*, ročník 254, č. 5501 1975-4-17, s. 586–588. ISSN 00280836. Doi:10.1038/254586a0.
- [4] MIR, M., BHADURI, B., WANG, R., a kol. Quantitative phase imaging. *Progress in Optics*, ročník 57 2012, s. 133–217.
- [5] KÜHN, J., CHARRIÉRE, F., COLOMB, T., a kol. Axial sub-nanometer accuracy in digital holographic microscopy. *Measurement Science and Technology*, ročník 19, č. 7 2008, str. 074007.
- [6] ZICHA, D., DUNN, G. A. An image processing system for cell behaviour studies in and subconfluent cultures. *Journal of Microscopy*, ročník 179, 1995, s. 11– 21.
- [7] DAVIES, H. G., WILKINS, M. H. F. Interference Microscopy and Mass Determination. *Nature*, ročník 169 1952, str. 541 Doi:10.1038/169541a0.
- [8] DUBOIS, F., YOURASSOWSKY, C., MONNOM, O., a kol. Digital holographic microscopy for the three-dimensional dynamic analysis of in vitro cancer cell migration. *JOURNAL OF BIOMEDICAL OPTICS*, ročník 11, č. 5 2006, str. 054032 Doi:10.1117/1.2357174.
- [9] LOVICAR, L., KVASNICA, L., CHMELÍK, R. Surface observation and measurement by means of digital holographic microscope with arbitrary degree of coherence. in *Proc SPIE*, ročník 7141 12 2008 Doi:10.1117/12.822410.
- [10] SLABÝ, T. *Koherencí řízený holografický mikroskop nové generace*. Dizertační práce brno: Vysoké učení technické, Fakulta strojího inženýrství, 2014. 91 p. Vedoucí práce: prof. RNDr. Radim Chmelík, Ph.D.
- [11] BORN, M., WOLF, E. *Principles of Optics*. seventh expanded edition Edition. Cambridge university press, 2002. ISBN-13: 978-0521642224.
- [12] SIRKS, J. L. Over een interferentiemicroscop. handelingen van het vierde Nederlandsch Natuur-en Geneskundig Congres, duben 1893, ročník 4, s. 92-95.
- [13] KRUG, W., RIENITZ, J., SCHULZ, G. *Contributions to interference microscopy*. Hilger Watts 1964.

- [14] DUNN, G. A. Transmitted-light interference microscopy: a technique born before its time. *Proceedings of the Royal Microscopical Society*, ročník 33 1998, str. 189–196.
- [15] KIM, M. *Digital Holographic Microscopy: Principles, Techniques, and Applications*. Springer Series in Optical Sciences Springer New York 2011, ISBN 9781441977922.
- [16] KOLMAN, P. *Koherenci řízený holografický mikroskop*. Dizertační práce 2010 vedoucí disertační práce doc. RNDr. Radim Chmelík, Ph.D.
- [17] CHERRY, R. J. *New Techniques of Optical Microscopy and Microspectroscopy*. Topics in Molecular and Structural Biology CRC-Press 1991 ISBN 9780849371172.
- [18] DUNN, G. A. Quantitative Interference Microscopy and Contact Inhibition (a brief history). 2014, workshop on Holographic microscopy and quantitative phase imaging (Brno). Randell Division, Guy's Campus, King's College London.
- [19] HESS, H. F. Systems and methods for 3-dimensional interferometric microscopy. 2006.
- [20] GUSTAFSSON, M. G. L., SEDAT, J. W., AGARD, D. A. Method and apparatus for three-dimensional microscopy with enhanced depth resolution. 1995.
- [21] BEWERSDORF, J., SCHMIDT, R., HELL, S. W. Comparison of I5M and 4Pi-microscopy. *Journal of Microscopy*, ročník 222 2006, s. 105 – 117.
- [22] IWAI, H., FANG-YEN, C., POPESCU, G., a kol. Quantitative phase imaging using actively stabilized phase-shifting low-coherence interferometry. *Opt. Lett.*, ročník 29, č. 20 Říjen 2004, s. 2399–2401. Doi:10.1364/OL.29.002399.
- [23] WANG, Z., MILLET, L., MIR, M., a kol. Spatial light interference microscopy (SLIM). *Opt. Express*, ročník 19, č. 2 Leden 2011, s. 1016–1026. Doi:10.1364/OE.19.001016.
- [24] WANG, Z., MARKS, D. L., CARNEY, P. S., a kol. Spatial light interference tomography (SLIT). *Opt. Express*, ročník 19, č. 21 Leden 2011, str. 19907–19918.
- [25] LEITH, E. N., UPATNIKES, J. Reconstructed Wavefronts and Communication Theory. *J. Opt. Soc. Am.*, ročník 52, č. 10 10 1962, s. 1123–1130. Doi:10.1364/JOSA.52.001123.
- [26] GABOR, D. A New Microscopic Principle. *Nature*, ročník 161 5 1948, s. 777–778 Doi:10.1038/161777a0.
- [27] SLABÝ, T., KOLMAN, P., DOSTÁL, Z., a kol. Off-axis setup taking full advantage of incoherent illumination in coherence-controlled holographic microscope. *Opt. Express*, ročník 21, č. 12 6 2013, s. 14747–14762 ISSN 1094-4087 Doi:10.1364/OE.21.014747.

- [28] VANLIGTEN, R. F., OSTERBERG, H. Holographic microscopy. *Nature Publishing Group*, 1966. Doi:10.1038/211282a0.
- [29] MARQUET, P., RAPPAZ, B., MAGISTRETTI, P. J., a kol. Digital holographic microscopy: a noninvasive contrast imaging technique allowing quantitative visualization of living cells with subwavelength axial accuracy. *Opt. Lett.*, ročník 30, č. 5 Březen 2005, s. 468–470. Doi:10.1364/OL.30.000468.
- [30] DOSTÁL, Z. *Automatizované procedury pro Koherenci řízený holografický mikroskop*. Dizertační práce 2016 vedoucí prof. RNDr. Radim Chmelík, Ph.D.
- [31] SHAKED, N. T., SATTERWHITE, L. L., RINEHART, M. T., a kol. *Holography, Research and Technologies*. kapitola Quantitative Analysis of Biological Cells Using Digital Holographic Microscopy, InTech, 2011 ISBN 978-953-307-227-2 s. 219–236. Doi:10.5772/15122.
- [32] BHADURI, B., PHAM, H., MIR, M., a kol. Diffraction phase microscopy with white light. *Opt. Lett.*, ročník 37, č. 6 Březen 2012, s. 1094–1096. Doi:10.1364/OL.37.001094.
- [33] LOŠŤÁK, M., CHMELÍK, R., SLABÁ, M., a kol. Coherence-controlled holographic microscopy in diffuse media. *Opt. Express*, ročník 22, č. 4 2 2014, s. 4180–4195 ISSN 1094-4087 Doi:10.1364/oe.22.004180.
- [34] JANEČKOVÁ, H., KOLMAN, P., VESELÝ, P., a kol. Digital holographic microscope with low spatial and temporal coherence of illumination. in *Photonics Europe*, ročník 7000 International Society for Optics and Photonics 2008 s. 70002E–70002E. Doi: 10.1117/12.800392.
- [35] KOLMAN, P., CHMELÍK, R. Coherence-controlled holographic microscope. *Opt. Express*, ročník 18, č. 21 10 2010, s. 21990–22003 ISSN 1094-4087 Doi:10.1364/OE.18.021990.
- [36] KÖHLER, A. Ein neues Beleuchtungsverfahren für mikrophotographische Zwecke. *Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie und mikroskopische Technik*, ročník 10 1893, s. 433–440.
- [37] PAVILLON, N., SEELAMANTULA, C. S., KÜHN, J., a kol. Suppression of the zero-order term in off-axis digital holography through nonlinear filtering. *Appl. Opt.*, ročník 48, č. 34 Dec 2009, s. H186–H195 Doi:10.1364/AO.48.00H186.
- [38] KOLMAN, P., CHMELÍK, R. Interferometrický systém a způsob měření prostoro-
vého rozložení indexu lomu. Červen 2016, patentový spis ČR, 306015. VUT Brno.
- [39] GABER, L. Optical sight with switchable reticle. 2002.
- [40] SAMSON, S. W. Pivoting mount for a firearm accessory. 2006.

- [41] HUANG, C. Laser sight for use in archery. 1995.
- [42] WILLMAN, J. A., WILLMAN, G. W. Optical sight device. 2009.
- [43] LIŠKA, M., BOČEK, V. Laserový difrakční zaměřovač. *Geodetický a kartografický obzor*, ročník 22, č. 12/1976 1976, s. 343 – 349.
- [44] VELECHOVSKÝ, K. *Vytyčování přímek využitím Fresnelovy difrakce*. Dizertační práce 2003 vedoucí práce prof. RNDr. Jiří Komrska, CSc.
- [45] KUTÍK, M. Přesná směrová měření s laserem. *Jemná mechanika a optika*, ročník 23, č. 10 1978, s. s. 186 – 192 ISSN 0447-6441 6/2003.
- [46] HEEL, A. C. S. *Advanced optical techniques*. Amsterdam: North-Holland 1967 includes bibliographies.
- [47] BURCH, J. M., WILLIAMS, D. C. Varifocal moire zone plates for straightness measurement. *Applied Optics*, ročník 16, č. 9 1977, s. 2445 – 2450.
- [48] WILLIAMS, D. C. Laser alignment techniques. *Physics in Technology*, ročník 14, 1983.
- [49] KAŠPAR, M. Malovýkonová laserová technika a její uplatnění v praxi. *Jemná mechanika a optika*, ročník 6 1998, s. 184 – 194 ISSN 0447-6441 ročník 43, 6/1998.
- [50] HERRMANNFELDT, W. B., LEE, M. J., SPRANZA, J. J., a kol. Precision Alignment Using a System of Large Rectangular Fresnel Lenses. *Appl. Opt.*, ročník 7, č. 6 Jun 1968, s. 995–1005 Doi:10.1364/AO.7.000995.
- [51] BETZ, H. D. An Asymmetry Method for High Precision Alignment with Laser Light. *Applied Optics*, ročník 8, č. 5 1969.
- [52] KOMRSKA, J., KOTAČKA, L. Difrakce světla na filtru s propustností $t(x_0, y_0) = \text{sgn}(x_0) \text{sgn}(y_0)$. *Jemná mechanika a optika*, ročník roč. 43, 1998, s. s. 107 – 110, ISSN 0447-6441.
- [53] HAO, Q., DACHENG, L., YONGTIAN, W. High-accuracy long distance alignment using single-mode optical fiber and phase plate. *Optics and Laser Technology*, ročník 34 2002, str. 287–292.
- [54] VELECHOVSKÝ, K., KOMRSKA, J. Využití Fresnelovy difrakce s nulovou intenzitou ve dvou na sebe kolmých směrech k vytyčování přímek. *Jemná mechanika a optika*, 2003, s. s. 186 – 192 ISSN 0447-6441 6/2003, roč. 48.
- [55] MCLEOD, J. H. The Axicon: A New Type of Optical Element. *Journal of the optical society of America*, ročník 44, č. 8 1954, s. 592 – 597.
- [56] MCLEOD, J. H. Axicons and Their and Uses. *Journal of the optical society of America*, ročník 50, č. 2 1960, s. 166 – 169.

- [57] THORLABS, Inc. [Online], 2016 [cit. 2018-05-12]. Dostupné z: www.thorlabs.de.
- [58] DOLAN-JENNER INDUSTRIES, [Online], 2018 [cit. 2018-05-22]. Dostupné z: www.dolan-jenner.com.
- [59] KOMRSKA, J. *Fourierovské metody v teorii difrakce a ve strukturní analýze*. první Edition. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství 2007 ISBN 978-80-214-3532-2 242 s.
- [60] KOMRSKA, J. *Vlnová optika. Část Difrakce světla*. první Edition. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství 2004 ISBN 80-214-2822-8 160 s.
- [61] Hankel Python library, [Online], 2018 [cit. 2018-05-20]. Dostupné z: <http://hankel.readthedocs.io/en/latest/>.
- [62] SKF CZ, a.s. [Online], 2018 [cit. 2018-05-22]. Dostupné z: www.skf.com.
- [63] BASLER AG, [Online], 2018 [cit. 2018-05-22]. Dostupné z: www.baslerweb.com.

